



FACULTAD DE MEDICINA
Y ODONTOLOGÍA

Trabajo de
fin de grado

Las aguas residuales como reservorio y vehículo de transmisión de determinantes de resistencia a antibióticos.

As augas residuais como depósito e vehículo de transmisión de determinantes de resistencia aos antibióticos.

Wastewater as a reservoir and vehicle for the transmission of antibiotic resistance determinants.

Autora: Rocío Cerecedo Bretal

Tutor: Carlos García Riestra

Cotutora: Sara Pereira Pardo

Departamento: Microbiología y
Parasitología

Curso Académico: 2020-2021

Convocatoria: 1ª

Junio de 2021

Trabajo de Fin de Grado presentado en la Facultad de Medicina y Odontología de la Universidad de Santiago de Compostela para la obtención del Grado en Medicina

ÍNDICE

ÍNDICE	2
RESUMEN	3
RESUMO	3
ABSTRACT	4
1. INTRODUCCIÓN	5
1. 1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.	5
1. 2. RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS.....	7
1. 2. 1. Plásmidos, transposones e integrones.....	8
1. 2. 2. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.....	9
1. 3. RESISTENCIA BACTERIANA Y MEDIO AMBIENTE.....	11
1. 4. MECANISMOS DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES EN LAS ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDARs).....	15
1. 4. 1. Pretratamiento.....	15
1. 4. 2. Tratamiento primario.....	16
1. 4. 3. Tratamiento secundario.	16
1. 4. 4. Tratamiento terciario.	16
1. 4. 5. Línea de fangos.....	16
2. OBJETIVOS	17
2. 1. OBJETIVO PRINCIPAL.....	17
2. 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.....	17
3. MATERIAL Y MÉTODOS	18
4. RESULTADOS	19
5. DISCUSIÓN Y SOLUCIONES	44
6. BIBLIOGRAFÍA	46

RESUMEN

Los antibióticos se consideran uno de los grandes éxitos de la medicina del siglo XX. Sin embargo, su uso inadecuado y abuso han hecho que en la actualidad nos encontremos con un problema con graves consecuencias: la resistencia bacteriana a los antibióticos. Este, ha pasado de ser considerado un problema individual a un problema global y de salud pública. Además, en los últimos años, empezó a abordarse desde un punto de vista ecológico y no solo desde el punto de vista sanitario como se estaba haciendo hasta entonces al descubrirse que, el desarrollo de bacterias resistentes no solo se relaciona con el uso de antibióticos sino también con cualquier alteración del equilibrio natural. Prueba de ello es la influencia que tienen los genes bacterianos responsables de la resistencia a metales pesados, en el desarrollo y evolución de las resistencias a antibióticos por su proximidad a los genes que median las mismas.

Recientes estudios demuestran que las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) desempeñan un papel importante en la propagación y difusión de resistencias bacterianas al medioambiente. Varios de estos trabajos constatan un incremento de los genes de resistencia a antibióticos y de bacterias resistentes a los mismos en medios acuáticos como resultado de un marcado aumento del consumo de antibióticos por parte de la población a nivel mundial. Se han detectado bacterias resistentes a antibióticos en aguas residuales urbanas, líquidos residuales hospitalarios, lodos cloacales, aguas subterráneas y ríos contaminados por el vertido de aguas residuales.

Este trabajo consiste en una revisión sistemática. En él se aportará información sobre los principales mecanismos que hacen a las bacterias resistentes a los antibióticos y, sobre el papel que desempeñan las aguas residuales mediante los procesos biológicos, físicos y químicos que tienen lugar en el proceso de depuración de estas, en la propagación de las resistencias.

Palabras clave: resistencia bacteriana, antibióticos, aguas residuales.

RESUMO

Os antibióticos considéranse uns dos grandes éxitos da medicina do século XX. Porén, o seu uso inadecuado e o seu abuso fixeron que na actualidade nos atopemos cun problema con graves consecuencias: a resistencia bacteriana aos antibióticos. Este, pasou de ser considerado un problema individual a un problema global e de saúde pública. Ademais, nos últimos anos, comezou a abordarse dende un punto de vista ecolóxico e non só dende un punto de vista sanitario como se estaba facendo ata entón, ao descubrirse que, o desenvolvemento de bacterias resistentes non só se relaciona co uso de antibióticos senón tamén con calquera alteración do equilibrio natural. Proba disto é a influencia que teñen os xenes bacterianos responsábeis da resistencia a metais pesados, no desenvolvemento e evolución das resistencias aos antibióticos pola súa proximidade aos xenes que median as mesmas.

Recentes estudos demostran que as Estacións Depuradoras de Augas Residuais (EDARs) desempeñan un papel importante na propagación e difusión de resistencias bacterianas ao medioambiente. Varios destes traballos constatan un incremento dos xenes de resistencia a antibióticos e de bacterias resistentes aos mesmos en medios acuáticos como resultado dun marcado aumento do consumo de antibióticos por parte da poboación a nivel mundial. Detectáronse bacterias resistentes a antibióticos en augas residuais urbanas, líquidos residuais hospitalarios, lodos cloacais, augas subterráneas e ríos contaminados polo vertido de augas residuais.

Este traballo consiste nunha revisión sistemática. Nel aportarase información sobre os principais mecanismos que fan ás bacterias resistentes aos antibióticos e sobre o papel que desenvolven as augas residuais mediante os procesos biolóxicos, físicos e químicos que teñen lugar no proceso de depuración das mesmas, na propagación das resistencias.

Palabras clave: resistencia bacteriana, antibióticos, augas residuais.

ABSTRACT

Antibiotics are considered one of the great successes of twentieth-century medicine. However, their inappropriate use and abuse have led to a problem with serious consequences: bacterial resistance to antibiotics. This has gone from being considered an individual problem to a global and public health problem. In addition, in recent years, it began to be approached from an ecological point of view and not only from a sanitary point of view, as was being done until then when it was discovered that the development of resistant bacteria is not only related to the use of antibiotics but also with any alteration of the natural balance. Proof of this is the influence of the bacterial genes responsible for resistance to heavy metals in the development and evolution of antibiotic resistance due to their proximity to the genes that mediate them.

Recent studies show that Wastewater Treatment Plants (WWTPs) play an important role in the propagation and diffusion of bacterial resistance to the environment. Several works confirm an increase in antibiotic resistance genes and antibiotic resistant bacteria in aquatic environments as a result of a marked increase in the consumption of antibiotics by the world population. Antibiotic resistant bacteria have been detected in urban wastewater, hospital waste liquids, sewage sludge, groundwater and rivers contaminated by wastewater discharge.

This work consists of a systematic review. It will provide information on the main mechanisms that make bacteria resistant to antibiotics and on the role that wastewater plays through the biological, physical and chemical processes that take place in the process of purifying them, in the propagation of the resistors.

Keywords: bacteria resistance, antibiotics, sewage water.

1. INTRODUCCIÓN.

Los antimicrobianos son moléculas naturales (producidas por organismos vivos como hongos o bacterias), sintéticas o semisintéticas, capaces de causar la muerte o la detención del crecimiento de microorganismos (bacterias, virus u hongos). (1) En esta revisión nos vamos a centrar en los antibióticos, un tipo de antimicrobianos con actividad antibacteriana.

Etimológicamente, la palabra antibiótico es un culturismo griego compuesto por un prefijo (anti= lo opuesto o contrario a algo), una raíz (-biós== vida) y un sufijo (-tikos= relativo a), lo que viene a significar “lo contrario a la vida”. (2)

El descubrimiento de los antibióticos se considera uno de los grandes hitos de la medicina. De hecho, es, junto con la potabilización del agua, uno de los grandes responsables del aumento de la esperanza de vida en todo el mundo. Tal es así que, a día de hoy, siguen existiendo diferencias en la esperanza de vida de aquellos países que tienen acceso a antibióticos y agua potable y de los que no lo tienen. (3)

Si bien es cierto que, para hablar del inicio del uso de los antibióticos nos tendríamos que trasladar a antiguas civilizaciones como Egipto o Roma, en las que era común el empleo de tierra para el tratamiento de las heridas (rica en una gran cantidad de microorganismos, productores de lo que hoy en día conocemos como antimicrobianos), cabe destacar un hecho histórico que tuvo lugar en el año 1928 de la mano de Alexander Flemming. Este acontecimiento fue el descubrimiento de la penicilina por serendipia (encontrar algo que no estabas buscando), mientras se encontraba estudiando las variantes cromóforas del *Staphylococcus aureus*. Sin embargo, a pesar de este gran hallazgo, no fue hasta aproximadamente veinte años después de su descubrimiento cuando, la penicilina se empezó a utilizar con fines terapéuticos en seres humanos. (3)

A partir de aquí se siguieron descubriendo una gran cantidad de antibióticos, tanto naturales como de síntesis, eficaces frente a un gran número de bacterias. Este hecho hizo y, continúa haciendo posible, la cura de un número considerable de enfermedades mortales hasta el momento, así como, llevar a cabo procedimientos que requieren el empleo de estos. (3)

1. 1. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ANTIBIÓTICOS.

Para conocer los mecanismos por los cuales las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos, es importante conocer previamente el mecanismo de acción de los mismos.

Podemos clasificar a los antibióticos en base a diferentes criterios como pueden ser: su espectro de acción, según el cual tenemos antibióticos de amplio espectro (activos frente a un gran número de especies) y antibióticos de espectro reducido (activos frente a un número reducido de especies), según su farmacocinética y farmacodinamia y según su mecanismo de acción. (4) Será en este último criterio en el que nos centraremos a continuación.

Según su mecanismo de acción, los antibióticos se clasifican en seis grandes grupos: (5)

1) Antibióticos que actúan inhibiendo la formación de la pared bacteriana. Para que estos antibióticos sean eficaces, es necesario que las bacterias sobre las que actúan se encuentren en crecimiento activo y, en un medio isotónico o hipotónico ya que este favorece el estallido celular cuando la pared se rompe. Suelen ser más activos frente a bacterias grampositivas por su mayor contenido en peptidoglicanos. A su vez, estos antibióticos se pueden clasificar en tres grupos en función de, en que fase de la síntesis de la pared bacteriana actúan:

- Inhibidores de la fase citoplasmática. Inhiben la síntesis de precursores de peptidoglicano. Ejemplos: fosfomicina, cicloserina. I
- Inhibidores de la fase de transporte de precursores. Bloquean a la molécula transportadora de los precursores en la membrana citoplasmática evitando que estos lleguen a la pared celular. Ejemplos: bacitracina, mureidomicinas.
- Inhibidores de la organización estructural del peptidoglicano. Evitan el ensamblaje de los peptidoglicanos en la parte más externa de la pared celular. Ejemplos: glucopéptidos, betalactámicos.

2) Antibióticos que actúan inhibiendo la síntesis proteica. Actúan sobre alguna de las estructuras que conforman los ribosomas bacterianos (subunidades 30s y 50s, ARN ribosómico y proteínas S y L) impidiendo la síntesis de proteínas. Según la fase del proceso sobre la que actúan los podemos clasificar a su vez en varios grupos:

- Inhibidores de la fase de activación. Impiden la unión de los aminoácidos a su respectivo aminoacil-ARN t para formar la cadena polipeptídica. Ejemplo: mupirocina.
- Inhibidores del inicio de la síntesis proteica. Bloquean la formación del complejo de iniciación que da lugar a la síntesis proteica. Ejemplos: linezolid, aminoglucósidos.
- Inhibidores de la fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma. Impiden la incorporación de nuevos aminoácidos a la cadena peptídica. Ejemplos: tetraciclinas.
- Inhibidores de la elongación. Bloquean la unión entre dos aminoácidos consecutivos (transpeptidación). Ejemplos: cloranfenicol, lincosamidas, macrólidos, estreptograminas, ácido fusídico

3) Antibióticos que actúan sobre la estructura y el metabolismo de los ácidos nucleicos. Inhiben los procesos de transcripción o de replicación o bien, actúan directamente sobre el ADN, dañándolo. Ejemplos: rifamicinas, quinolonas.

4) Antibióticos que actúan sobre la membrana citoplasmática. Modifican la permeabilidad de la membrana. De este modo, pueden provocar la salida de iones intracelulares como el potasio, así como de elementos esenciales para la supervivencia de las bacterias. O bien, pueden provocar la entrada de sustancias que, a altas concentraciones son dañinas para estas células. Ejemplos: polimixinas, ionóforos y formadores de poros.

5) Antibióticos que actúan sobre las vías metabólicas. Bloquean la síntesis de folatos en las bacterias, necesarios para la formación de bases nitrogenadas y, por lo tanto, de ácidos nucleicos. Ejemplos: sulfamidas, diaminopirimidinas.

6) Antibióticos que bloquean los mecanismos de resistencia. Dentro de este grupo los más destacados son los inhibidores de betalactamasas de serina (ácido clavulánico, sulbactam y tazobactam). Estos carecen de actividad antibacteriana intrínseca, pero son muy importantes cuando se combinan con betalactámicos ya que, se unen de forma irreversible a algunas betalactamasas, protegiendo de su acción a los antibióticos betalactámicos.

Tabla 1: Resumen de la clasificación de los antibióticos según su mecanismo de acción.

TIPO DE ANTIBIÓTICO	MECANISMO DE ACCIÓN	EJEMPLOS
Inhibidores de la formación de la pared bacteriana	Inhibición de la fase citoplasmática	Fosfomicina, cicloserina
	Inhibición de la fase de transporte de precursores	Bacitracina, mureidomicinas
	Inhibición de la organización estructural del peptidoglicano	Glucopéptidos, betalactámicos
Inhibidores de la síntesis proteica	Inhibición de la fase de activación	Mupirocina
	Inhibición del inicio de la síntesis proteica	Linezolid, aminoglucósidos
	Inhibición de la fijación del aminoacil-ARNt al ribosoma	Tetraciclinas
	Inhibidores de la elongación	Lincosamidas, macrólidos
Modificadores de la estructura y metabolismo de ácidos nucleicos	Inhibición de la transcripción y de la replicación	Rifamicinas, quinolonas
	Daño directo sobre el ADN	Nitroimidazoles, nitrofuranos
Modificadores de la membrana citoplasmática	Modificación de la permeabilidad de la membrana citoplasmática con la consecuente entrada y salida de sustancias	Polimixinas, formadores de poros
Inhibidores de vías metabólicas	Bloqueo de la síntesis de sustancias necesarias para la formación de ácidos nucleicos (ej.: folatos)	Sulfamidas, diaminopirimidinas
Inhibidores de mecanismos de resistencia	Unión e inhibición irreversible de betalactamasas de serina	Ácido clavulánico, sulbactam, tazobactam

1. 2. RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIBIÓTICOS.

Como ya se mencionó anteriormente, el descubrimiento de los antibióticos es uno de los grandes éxitos de la medicina del siglo XX. Estos permitieron incrementar considerablemente la esperanza de vida desde entonces, haciendo posible el tratamiento y la cura de muchas enfermedades que, resultaban mortales hasta ese momento. Sin

embargo, hoy en día nos encontramos con un grave problema de salud a nivel mundial: la resistencia bacteriana a los antibióticos. Esta es consecuencia de su uso indiscriminado e irracional, tanto en seres humanos como en agricultura, ganadería o veterinaria, donde su control es todavía más difícil y, la presión evolutiva generada por su uso terapéutico. En un primer momento, se pensó que una forma de solucionar este problema era la creación de nuevos antibacterianos, pero este hecho dio lugar a un problema todavía mayor como es la aparición de cepas bacterianas multirresistentes (aquellas bacterias que son resistentes a los antibióticos más utilizados en los hospitales), las cuales son responsables de infecciones con elevada morbilidad y elevados costes sanitarios, tanto directos como indirectos. (6)

La Organización Mundial de la Salud (OMS) habla de una posible era postantibiótica, en la que ya no será posible el tratamiento de infecciones fácilmente curables con antibióticos hasta entonces, ni llevar a cabo procedimientos quirúrgicos que requieran el uso de los mismos como profilaxis. (7) Además, el informe O' Neill de 2014 dice que, las infecciones causadas por bacterias resistentes a antibióticos serán la primera causa de muerte de aquí al año 2050. (8)

La resistencia a los antimicrobianos es el proceso evolutivo por el que, un microorganismo es capaz de sobrevivir y reproducirse en la presencia de un antibiótico, a una determinada concentración. Como se verá más adelante, este proceso se ve favorecido y acelerado por el uso, tanto adecuado como inadecuado, de los antibióticos. Pese a ello, no deja de ser un proceso natural, que existe desde hace millones de años por un mecanismo de selección natural, en el que algunas bacterias deben desarrollar mecanismos, que les permitan adaptarse y sobrevivir en el mismo medio que otros microorganismos que, son capaces de producir sustancias antimicrobianas naturales. (6)

Podemos hablar de dos grandes tipos de resistencia bacteriana, la resistencia natural, que tiene una base genética intrínseca y, la resistencia adquirida. (9)

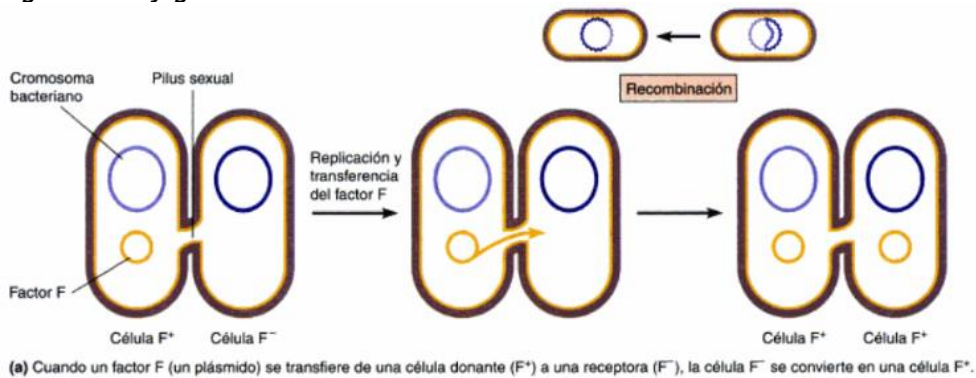
La resistencia bacteriana natural a los antibióticos está determinada genéticamente, por lo que es propia de cada familia, especie o grupo bacteriano y, es un mecanismo permanente, por lo que no es variable. Algunos ejemplos serían: *Proteus mirabilis* y su resistencia a las tetraciclinas por un mecanismo natural por el que expulsa a estos antibióticos, *Klebsiella pneumoniae* y su resistencia a las penicilinas (ampicilina y amoxicilina) por su producción natural de betalactamasas o, los bacilos gramnegativos aerobios y su resistencia a la clindamicina, al carecer de un sitio de unión a la misma (sitio blanco). (9)

La resistencia bacteriana adquirida a los antibióticos es una característica de una especie bacteriana que, de forma natural es sensible a un antibiótico, pero que por modificaciones genéticas como pueden ser mutaciones o, la adquisición de genes de resistencia (plásmidos, transposones o integrones), una cepa de esa especie bacteriana se hace resistente a un antibiótico. Son evolutivas y su frecuencia traduce el empleo de antibióticos en una sociedad. (9) Será en este tipo de resistencia en el que nos centraremos a continuación.

1. 2. 1. Plásmidos, transposones e integrones.

Los plásmidos y los transposones, son elementos genéticos móviles en los que se transportan genes de resistencia (genes R). Los plásmidos, son fragmentos de ADN bacteriano circular, de longitud variable, capaces de replicarse independientemente de la maquinaria celular. Los transposones, son secuencias de ADN de doble cadena que, se pueden traslocar entre cromosomas, entre plásmidos o, entre un cromosoma y un plásmido. Mediante la recombinación bacteriana y, la capacidad de los plásmidos de trasladarse de una célula a otra durante la conjugación, permiten la adquisición de genes de resistencia entre bacterias de igual o de distinta especie, facilitando así la expansión de la resistencia. (9)

Figura 1: Conjugación bacteriana.



Fuente: *Introducción a la microbiología (Tortora et al.)*.

Los integrones, son elementos génicos presentes en algunos plásmidos y transposones que, les permiten a las bacterias capturar varios genes exógenos, dando lugar a la aparición de cepas bacterianas multirresistentes. (9)

1. 2. 2. Mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos.

La resistencia bacteriana a los antibióticos es un tema tan amplio que se puede tratar desde diferentes perspectivas por lo que, antes de centrarnos en los mecanismos por los cuales las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos, es importante tener claros tres conceptos: la resistencia individual, la resistencia poblacional y la resistencia poblacional en microorganismos que están produciendo una infección. (10)

La resistencia individual se refiere a los mecanismos bioquímicos y moleculares por los que las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos. Engloba las interacciones moleculares entre el material genético y metabólico de una bacteria y, un determinado antibiótico ya que, no es suficiente con que el microorganismo cuente con un gen o varios genes que lo doten de un determinado mecanismo de resistencia, sino que, además, este o estos tienen que expresarse en una cantidad y con una calidad suficientes para que, dicho mecanismo se lleve a cabo correctamente. Un ejemplo de esto lo constituye *Escherichia coli* ya que cuenta, de forma natural en su cromosoma, con un gen que codifica para una betalactamasa de clase C (tipo AmpC), pero carece del promotor natural del gen (AmpR), dando lugar a una expresión mínima de esa enzima y que, como consecuencia, *E. coli* sea sensible a betalactámicos como la ampicilina. (10) En este punto será en el que nos centraremos después.

La resistencia poblacional, hace referencia al comportamiento *in vitro* (en estudios realizados en un laboratorio clínico) de una población bacteriana, cuando se enfrenta a

una concentración determinada de un antibiótico, durante un período de tiempo determinado. Estos estudios son importantes ya que nos informan sobre la sensibilidad o resistencia a un antibiótico de una determinada población de bacterias, permitiéndonos orientar el tratamiento de las infecciones causadas por las mismas, aunque no siempre los resultados obtenidos *in vitro* se corresponden con lo que sucede en la realidad. (10)

La resistencia poblacional en microorganismos que están causando una infección, habla sobre la eficacia terapéutica, por lo que aquí, entran en juego muchos factores como el sitio de la infección, las propiedades farmacocinéticas del antibiótico, el estado inmunológico del paciente, el tamaño de la bacteria, etc. Y, el parámetro que la determina es la recuperación del estado de salud del paciente. (10)

A continuación, nos centraremos en la resistencia bacteriana individual. De este modo, desde el punto de vista molecular y bioquímico, podemos agrupar a los mecanismos bacterianos de resistencia en cuatro grupos: la inactivación del antibiótico, la alteración del sitio blanco del antibiótico, la alteración de las barreras de permeabilidad y las bombas de eflujo. Además, hay que tener en cuenta que estos mecanismos pueden suceder simultáneamente. (9)

1) Inactivación enzimática del antibiótico. Consiste en la producción de enzimas bacterianas que destruyen o modifican la estructura química del antibiótico. Algunos ejemplos de enzimas que destruyen la estructura del antibiótico son las betalactamasas (hidrolizan el núcleo de los betalactámicos rompiendo el enlace amida) y la eritromicina esterasa (hidroliza el anillo lactona de la eritromicina) mientras que, algunos ejemplos de enzimas que modifican su estructura química son las acetilasas (modifican la estructura química de los aminoglucósidos), las adenilasas (modifican la estructura química de las lincosamidas) y las fosfatasas (modifican la estructura química de las estreptograminas), entre otras. Hoy en día se considera el mecanismo más importante de resistencia a antibióticos. (9)

2) Modificaciones en el sitio blanco del antibiótico. Consisten en alteraciones en el lugar específico de la célula bacteriana sobre el que actúa el antibiótico como la pared celular, la membrana celular o las subunidades 30s o 50s ribosomales, entre otras. Algunos ejemplos serían la mutación de los genes *Gyr_A* y *Gyr_B*, que codifican las topoisomerasas II y IV, respectivamente, y que dotan a bacterias como *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Pseudomonas aureginosa* o *E.coli*, de resistencia a las quinolonas, la mutación en la subunidad 50s del ARN ribosomal, que dota a *S. aureus* y a *S. epidermidis* de resistencia a tetraciclinas, cloranfenicol y macrólidos, o la mutación en las PBP (proteínas fijadoras de penicilinas) del *Streptococcus pneumoniae*, que le confieren resistencia a las penicilinas, e incluso a ceftriaxona. (9)

3) Alteración de las barreras de permeabilidad. Consiste en la alteración de receptores bacterianos específicos a antibióticos o, en alteraciones estructurales en los elementos que componen la envoltura celular (membrana o pared bacteriana) y que influyen en la permeabilidad, en la pérdida de transporte activo a través de la membrana celular o, en la expresión de bombas de eflujo. (9)

4) Bombas de eflujo. Son proteínas transmembrana que forman canales encargados de internalizar y de expulsar a los antibióticos en las células bacterianas. Existe una amplia variedad de bombas de eflujo que dotan de resistencia tanto a bacterias grampositivas

como gramnegativas. En este último caso, además de proteínas transmembrana intervienen también proteínas de la membrana celular externa y del citoplasma. El mecanismo por el cual estas bombas de eflujo dotan de resistencia a las bacterias, es porque son capaces de expulsar el antibiótico de las células tan rápido como entra en las mismas, Este mecanismo aporta resistencia a un gran número de antibacterianos como las tetraciclinas, quinolonas, cloranfenicol y betalactámicos, así como también a antisépticos y desinfectantes. (9)

1. 3. RESISTENCIA BACTERIANA Y MEDIO AMBIENTE.

El medio ambiente desempeña un papel fundamental en la adquisición y propagación de resistencias a los antibióticos. (11) Cada vez, hay más pruebas que determinan que los genes de resistencia presentes en bacterias ambientales, constituyen el principal reservorio de genes de resistencia de aquellas que causan infecciones en seres humanos. (12)

Se han encontrado bacterias resistentes a diferentes antibióticos en lugares aislados del exterior durante al menos 4 millones de años, así como genes de resistencia a betalactámicos, tetraciclinas y polimixinas, en el ADN de bacterias de hace 30000 años. (13) También se han descubierto un gran número de bacterias ambientales, diferentes desde el punto de vista filogenético, capaces de utilizar antibióticos como única fuente de carbono, lo cual, hace pensar que cuentan con un gran reservorio de genes de resistencia. (13)

Algunos estudios recientes demuestran que, el intercambio de genes de resistencia a antibióticos entre bacterias ambientales y patógenas humanas es un hecho reciente, así como, que las secuencias génicas que movilizan a estos genes (plásmidos, transposones e integrones) también están presentes en bacterias ambientales, lo que ayuda a la diseminación de estos. Además, la existencia en la naturaleza de esta amplia variedad de genes de resistencia hace pensar, que su única función no es solo la de defender a las bacterias de los antibióticos. (13)

El consumo humano de antibióticos se disparó en un 36% desde el año 2000. Sin embargo, el 70% de los antibióticos utilizados hoy en día, son administrados a animales y, se estima que el empleo de antimicrobianos para el ganado aumentará en un 67% de aquí a 2030 ya que los antibióticos se utilizan cada vez más en ganadería intensiva para potenciar el crecimiento, sobre todo en países en vías de desarrollo (en la Unión Europea esta práctica está prohibida desde el año 2006). Estos fármacos también se emplean en agricultura y, hasta el 75% de los mismos se pueden perder en el medio ambiente. (14)

La selección para la resistencia se produce de forma natural en el medio, es decir, sin la intervención humana, en poblaciones bacterianas presentes en el suelo, el agua y otros hábitats. Sin embargo, el uso de millones de toneladas de antibióticos al año y, la liberación de residuos de estos al medio natural, aumentan la presión sobre la selección de resistencias, incrementando el número de bacterias resistentes. (15)

Si bien es cierto que aún falta mucho por investigar sobre el papel que juega el medio ambiente en la resistencia a los antibióticos, se sabe que depende en gran medida del tiempo que permanezcan activos los antimicrobianos en el medio y, del grado de contaminación ambiental (más del 50% de los residuos sólidos municipales terminan en

basureros y vertederos a cielo abierto entre los que se pueden encontrar medicamentos sin utilizar o incluso caducados). (14)

La liberación al medio natural de antibióticos y de otros compuestos con actividad antimicrobiana como los desinfectantes y, los metales pesados, favorecen el desarrollo de bacterias resistentes. Estos compuestos se encuentran a diferentes concentraciones en el agua y en el suelo. Las aguas residuales municipales cuentan con una gran cantidad de contaminantes: productos farmacéuticos y de higiene personal, residuos hospitalarios con elevadas concentraciones de antibióticos y desinfectantes y, compuestos industriales ricos en metales pesados. Algunas industrias farmacéuticas liberan directamente al medio ambiente cantidades de antibióticos superiores a las empleadas con fines terapéuticos en seres humanos. Como es lógico, la selección de resistencias es mayor en zonas más contaminadas, sin embargo, la baja concentración de antibióticos también desempeña un papel muy importante en este proceso ya que, se vio que es insuficiente para resultar letal para las bacterias, pero suficiente para favorecer la selección de una resistencia, como ocurre en la mayoría de los efluentes. En la actualidad se están desarrollando estudios para averiguar cuál es el umbral de concentración de antibióticos para que no se produzca dicha selección. (14) Por esta razón, y debido a la creciente conciencia de que, la presencia de estos compuestos en el medio ambiente puede representar una amenaza para la salud humana y los sistemas ecológicos, la Comisión de la UE ha incluido tres antibióticos macrólidos (azitromicina, claritromicina, eritromicina) (Decisión de la UE, 2015 / 495 de 20 de marzo de 2015), así como amoxicilina y ciprofloxacina (Decisión de la UE, 2018/840 de 5 de junio de 2018) en la Lista de Vigilancia de la Unión Europea como sustancias sujetas a seguimiento. (16)

Se encontraron genes de resistencia en fagos del 77% de muestras de heces humanas. Esto puede contribuir a la expansión de la resistencia tanto en el intestino como fuera del mismo. Hasta el 80% de los antibióticos que se consumen, se excretan a través de la orina y de las heces sin metabolizar, junto con las bacterias resistentes a los mismos. De esta forma llegan al medio natural, a través de los sistemas de alcantarillado, del agua y de la tierra, donde interactúan con bacterias ambientales aquí presentes incrementando así, la presión de selección e, interactuando con otros contaminantes favoreciendo la expansión de las resistencias. Además, cuando nuestro cuerpo entra en contacto con un antibiótico este actúa tanto sobre las bacterias patógenas causantes de enfermedades como sobre las bacterias que forman parte de nuestra flora, que son la mayoría, condicionando en las mismas la selección y el desarrollo de genes de resistencia. Por lo tanto, este proceso se produce tanto con el uso adecuado como inadecuado de los antibióticos. (13)

Los niveles de concentración de antibióticos y de otros contaminantes en los ríos, traducen los adecuados o inadecuados tratamientos de las aguas residuales en las estaciones depuradoras de las mismas, así como el consumo de antibióticos en una población. Por lo general, las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) están diseñadas con el objetivo de eliminar contaminantes convencionales como nutrientes, materia orgánica, partículas en suspensión y, en algunos casos, patógenos, pero no antibióticos ni otros fármacos. (16) Además, residuos agrícolas como el estiércol de los animales, también pueden contener antibióticos en concentraciones similares o, incluso superiores a las que se utilizan para el tratamiento de infecciones en seres humanos. De estos antibióticos que llegan al medio ambiente, algunos son inactivados cuando se unen a otras sustancias sólidas, pero con otros no ocurre lo mismo por lo que, ejercen su selección sobre las bacterias del medio. En algunas situaciones, los antibióticos o sus

restos son capaces de ejercer un efecto sinérgico junto a otros contaminantes como pueden ser los metales pesados, incrementando esta selección, siendo superior que las diferentes sustancias cuando actúan por separado. Los metales pesados están presentes en zonas agrícolas, urbanas e industriales por lo que se cree que bacterias expuestas a estas sustancias presentan resistencia a ciertos antibióticos a pesar de no sufrir una presión selectiva directa por parte de los mismos. (14)

Las aguas residuales y las aguas procedentes de la ganadería y de la agricultura, contienen tantos antibióticos como bacterias resistentes a los mismos por lo que, el vertido al medio ambiente de aguas residuales sin el tratamiento adecuado contribuye en gran medida a aumentar las resistencias en el medio natural. Sin embargo, es un problema difícil de resolver ya que, incluso en países en los que se invierte una gran cantidad de dinero para el tratamiento de estas se observan diferencias en la concentración de bacterias resistentes, de unas zonas a otras. Además, se han obtenido resultados contradictorios en cuanto a la eficacia del tratamiento de las aguas residuales: algunos estudios demuestran una mayor cantidad de bacterias en las aguas afluentes (que entran en las estaciones depuradoras) respecto a las aguas efluentes (que salen de las estaciones depuradoras) y, por lo tanto, que las estaciones depuradoras de aguas residuales son eficaces para solventar este problema, mientras que, otros estudios demuestran que las bacterias resistentes se encuentran en mayor concentración en las aguas efluentes que en las afluentes. Esto último puede explicarse debido a que las depuradoras constituyen un espacio muy pequeño en el que conviven bacterias ambientales, humanas y animales y, además, cuentan con unas condiciones adecuadas para la adquisición de resistencias ya que, en ellas hay nutrientes que pueden favorecer la transmisión horizontal de dichas resistencias. Es por ello por lo que, actualmente, las depuradoras se consideran uno de los principales mecanismos de selección y dispersión de bacterias resistentes y de genes de resistencia. (14) Por ejemplo, en un estudio realizado en Austria se vio que en más de un 50% de muestras de aguas residuales de depuradoras había cepas de *E.coli* productoras de BLEEs. Por lo tanto, los lodos de las aguas residuales y cloacales suponen un importante sistema de vigilancia de la cantidad de bacterias resistentes y de genes de resistencia a antibióticos presentes en una población. (17)

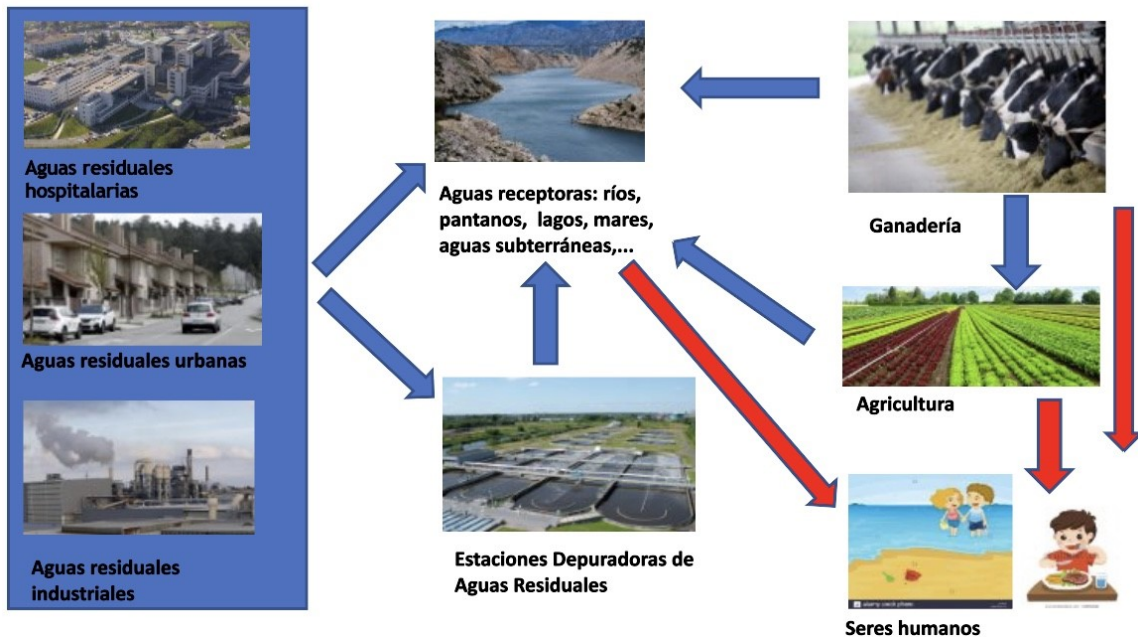
El intestino humano y animal también es un lugar adecuado para la transferencia de genes de resistencia entre individuos de igual o de distinta especie y, para la selección de bacterias resistentes ya que, en él hay una gran densidad bacteriana. Las bacterias presentes en suelos, ríos y mares pueden adquirir una resistencia al entrar en contacto con otras bacterias resistentes, antibióticos, desinfectantes u otros productos que son vertidos a estos medios como consecuencia de la actividad humana. Asimismo, las personas y los animales nos podemos exponer a ellas a través de los alimentos, del agua y del aire. Las bacterias resistentes pueden estar presentes tanto en el agua potable como en las aguas sin tratar. (18) Entre las principales corrientes de deshechos se encuentran las aguas residuales, el estiércol y las aguas procedentes de la agricultura, ricas en residuos de antibióticos y bacterias resistentes a los mismos. De hecho, las bacterias resistentes a múltiples antibióticos son frecuentes en aguas marinas y en sedimentos cercanos a zonas de vertido de agricultura, actividad industrial y municipios. (14)

En la actualidad, disponemos de mecanismos que permiten reducir e, incluso eliminar, la cantidad de antibióticos y de bacterias resistentes que llegan al medio natural. Algunos de estos mecanismos son el tratamiento secundario y terciario de las aguas residuales, la filtración por membranas, la ozonización, la desinfección y el tratamiento térmico, el

tratamiento de desechos de animales antes de aplicarlos a las tierras, etc. Sin embargo, siguen existiendo a día de hoy, un gran número de limitaciones para aplicar las mismas, en la mayoría de los casos, de tipo económico. Además, sigue existiendo controversia sobre si estas medidas son suficientes o no para acabar con el problema de las resistencias ya que, hay quien considera que es un tema inabarcable debido a la gran variedad de mecanismos de resistencia existentes, a la capacidad de interacción entre un número infinito de bacterias, a la diversidad de la transferencia génica, etc. (19)

De lo que no hay duda a día de hoy, es de que en aquellas zonas en las que hay actividad humana, los niveles de antibióticos y de resistencia a los mismos son mayores, que en el laboratorio, algunas bacterias son capaces de adquirir resistencia a un determinado antibiótico, cuando se exponen a cantidades del mismo similares a las que se encuentran en el medio ambiente (más bajas que las que se emplean con fines terapéuticos) y, que genes de resistencia descubiertos recientemente e, importantes desde el punto de vista clínico, tienen su origen en bacterias ambientales, lo que nos lleva a pensar en una posible transmisión a través de la cadena alimentaria y, por la exposición directa a entornos contaminados. (14)

Figura 2: Esquema sobre la relación entre la resistencia bacteriana y el medio ambiente.



En la actualidad, la resistencia bacteriana se considera también un problema global ya que el mundo está hiperconectado, ya sea a través de mercancías o de viajeros por lo que, las cepas resistentes pueden llegar a cualquier lugar. La diseminación de resistencias a larga distancia podría verse favorecida también por animales como las aves migratorias. (13)

La prevalencia local y global de una resistencia depende de la diseminación local y global de unos clones concretos que son, resistentes y capaces de colonizar y sobrevivir en algunos ecosistemas. El hecho de que una bacteria adquiera una resistencia tiene asociado un coste biológico ya que reduce la competitividad de las mismas y, la magnitud del mismo determina la estabilidad y el potencial de revertir la resistencia. (13)

Sin embargo, la proporción en que bacterias resistentes colonizan a personas sanas no es igual en todo el mundo como ocurre, por ejemplo, con bacterias que se transmiten por vía

fecal-oral por lo que la extensión de la resistencia está influida por factores como la falta de agua potable, la pobreza y la densidad de la población. (13)

1. 4. MECANISMOS DE DEPURACIÓN DE AGUAS RESIDUALES EN LAS ESTACIONES DEPURADORAS DE AGUAS RESIDUALES (EDARs).

Como se dijo anteriormente, las depuradoras suponen un medio óptimo para la transferencia y propagación de resistencias bacterianas, al disponer de las condiciones adecuadas para ello.

Las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) son plantas encargadas de recoger las aguas de una población o de una industria, reducir su contaminación mediante ciertos tratamientos y procesos y, finalmente, devolverlas a un cauce natural como embalses, ríos, mares, etc. (20)

Los principales objetivos de las EDARs son eliminar aceites, partículas sólidas en suspensión y sedimentos sólidos, compuestos ricos en fósforo y amoníaco y transformar residuos retenidos en lodos estables para que sean reutilizados de forma correcta. (21) Un informe realizado por Greenpeace en el año 2005, afirma que sólo el 11% de las aguas de los ríos españoles y, el 16% de los acuíferos, tienen una calidad aceptable según los criterios establecidos por la Directiva Marco de la Unión Europea para ello. (22)

Según el tratamiento empleado, las podemos clasificar en dos grupos, si bien es cierto que, en la actualidad, en muchas de las plantas depuradoras se combinan ambos procesos: (21)

- Físicoquímicas: el tratamiento de las aguas se basa en la aplicación de reactivos químicos que facilitan la decantación de sólidos en suspensión, lo cual es bastante costoso desde el punto de vista económico.
- Biológicas: en este caso el tratamiento de las aguas residuales corre a cargo de microorganismos que degradan materia orgánica en suspensión, dando lugar a sedimentos sólidos más fáciles de separar.

La eficacia del tratamiento de las aguas residuales se mide principalmente mediante el % de disminución de sólidos en suspensión y la cantidad de oxígeno disuelto consumido por los microorganismos para la oxidación de la materia orgánica (DBO), de modo que, cuanto mayor es el valor de este, peor es la calidad del agua. (23)

A continuación, se desarrollarán los diferentes procesos que se llevan a cabo en las EDARs para mejorar la calidad del agua y, contribuir a mantener un caudal ecológico adecuado: pretratamiento, tratamiento primario, tratamiento secundario, tratamiento terciario y línea de fangos.

1. 4. 1. Pretratamiento.

El pretratamiento, tal y como su nombre indica, es un proceso que se lleva a cabo antes de que las aguas residuales entren en las estaciones depuradoras propiamente dichas. En él se eliminan los sólidos de gran tamaño mediante rejillas o filtros, dando inicio al proceso de limpieza y evitando que las bombas y máquinas presentes en las estaciones sean

obstruidas y dañadas por estas sustancias. Aquí las aguas residuales se someten a los siguientes procedimientos: (23)

- Desbaste: mediante rejillas y tamices se separan y eliminan los sólidos de mayor tamaño.
- Desarenado: por decantación, inyección de aire o centrifugado se eliminan restos de arenas.
- Desengrasado: se eliminan aceites y grasas en forma de espumas flotantes.

1. 4. 2. Tratamiento primario.

El tratamiento primario engloba a los procesos físicos llevados a cabo en las propias EDARs para eliminar las partículas en suspensión que no fueron eliminadas en la etapa anterior. En función de la estación depuradora y de la densidad de las partículas, se puede emplear la decantación o la flotación (en caso de sólidos que tengan una densidad similar a la del agua). (23)

1. 4. 3. Tratamiento secundario.

El tratamiento secundario también es conocido como tratamiento biológico. Es la etapa más importante de todas en el proceso de depuración de las aguas ya que, gracias a él se consiguen reducir en un 90% los sólidos en suspensión y en un 70-90% el DBO.

Este tratamiento puede ser de diferentes tipos (fangos activos, aireación prolongada, lechos bacterianos, ...), sin embargo, los podemos agrupar en dos: tratamientos de biomasa suspendida y tratamientos de biomasa fija. En los primeros (fangos activos, aireación prolongada), la biomasa se encuentra suspendida en el agua en contacto con la contaminación orgánica mientras que, en los segundos (lechos bacterianos, biodiscos), la biomasa se fija sobre un material que se pone en contacto con el agua y los contaminantes orgánicos. De todos ellos, uno de los sistemas más extendidos y eficaces son los fangos activos. (23)

1. 4. 4. Tratamiento terciario.

El tratamiento terciario es el proceso final que sufren las aguas residuales antes de devolverlas a su cauce natural. En él se llevan a cabo procedimientos biológicos y fisicoquímicos como la cloración, filtración y/o precipitación, con el objetivo de reducir al máximo la cantidad de nutrientes inorgánicos, sobre todo, fosfatos y nitratos. Este tratamiento no está disponible en todas las estaciones depuradoras, sin embargo, desde el año 2012 es obligada su implantación en aquellas zonas con riesgo de eutrofización (enriquecimiento nutricional del agua que provoca un crecimiento anormal de algas, plantas acuáticas y microorganismos) ya que conlleva a un mayor consumo de oxígeno por las nuevas especies, en detrimento de otras existentes previamente. (23)

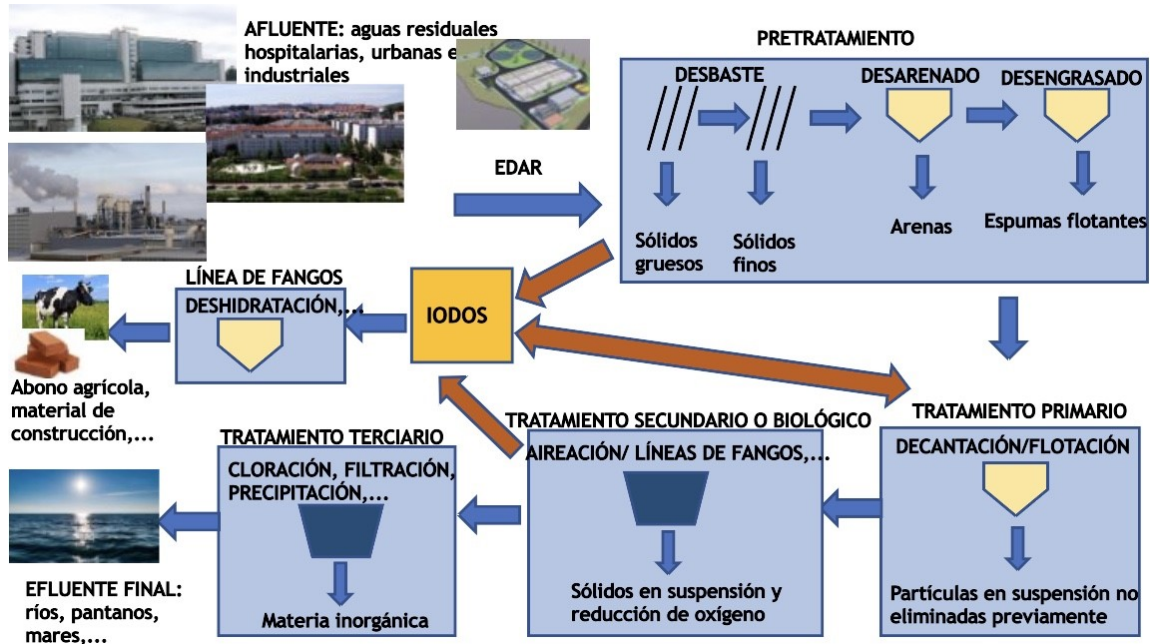
1. 4. 5. Línea de fangos.

Como consecuencia de los procesos llevados a cabo en el tratamiento primario y secundario de las aguas residuales, se generan fangos (barro viscoso, que en ocasiones contiene restos orgánicos y que se forma en el fondo de una corriente o de aguas estancadas). Estos también van a ser tratados en las estaciones depuradoras

para reducir su volumen y su capacidad de fermentación y, posteriormente van a ser reutilizados con fines agrícolas como abono o, para la fabricación de material de construcción como ladrillos refractarios. (23)

Los procesos llevados a cabo en esta etapa son: espesamiento por gravedad-decantación o por flotación (para reducir el volumen), estabilización mediante digestión aerobia o anaerobia o bien, mediante procesos químicos (para eliminar malos olores, materia orgánica, organismos patógenos, etc.) y secado, mediante eras de secado, filtros de banda, centrifugación o secado térmico (para eliminar todavía más agua y reducir el tamaño de los lodos facilitando así su transporte y reutilización). (21)

Figura 3: Esquema del funcionamiento de una EDAR.



2. OBJETIVOS.

2. 1. OBJETIVO PRINCIPAL.

El principal objetivo de esta revisión es comprobar si las aguas residuales actúan como reservorio y vehículo de transmisión de determinantes de resistencia a antibióticos.

2. 2. OBJETIVOS SECUNDARIOS.

- Establecer la relación existente entre la resistencia bacteriana y el medioambiente.
- Determinar las consecuencias que tienen, tanto el uso adecuado como inadecuado de los antibióticos, en seres humanos, ganadería y agricultura.
- Conocer los diferentes procesos que tienen lugar en la depuración de las aguas residuales en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs) y, valorar cómo influyen en la adquisición y transmisión de resistencias.
- Tomar conciencia del problema al que nos enfrentamos y valorar posibles soluciones y líneas de investigación futuras sobre el tema.

3. MATERIAL Y MÉTODOS.

Para la realización de este trabajo se tomaron como punto de partida una serie de documentos aportados por el tutor sobre los principales mecanismos de resistencia bacteriana a los antibióticos ("*Aspectos básicos de los mecanismos de resistencia bacteriana. Revista Médica MD.*"), la repercusión de las infecciones causadas por gérmenes gramnegativos resistentes ("*Infección por gramnegativos resistentes. Epidemiología de los bacilos gramnegativos multirresistentes*"), los procedimientos llevados a cabo con las muestras en los laboratorios de microbiología clínica ("*Procedimientos en Microbiología Clínica. Recomendaciones de la Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*"), la distribución global del gen de resistencia a la colistina ("*The global distribution and spread of the mobilized colistin resistance gene mcr-1. Nature communication.*"), el impacto que supone la resistencia bacteriana en nuestras vidas ("*Registro hospitalario de pacientes afectados por las resistencias bacterianas. Sociedad Española de Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica (SEIMC)*"), etc. Una vez leídos y analizados los mismos se procedió a realizar la revisión sistemática en si misma siguiendo la metodología PRISMA. Para ello se hizo una búsqueda avanzada en PubMed empleando los siguientes términos (((wastewater) OR (effluent)) OR (sewage water)) AND (bacteria resistance) debido a las diferentes traducciones al inglés que tienen los términos "aguas residuales". Ya que el número de resultados obtenidos mediante la búsqueda anterior fue muy extenso (124 artículos) se decidió establecer una serie de criterios de inclusión para acotar la búsqueda: que los artículos estuviesen publicados en el último año, que tuviesen acceso gratuito al texto completo y que tratasen sobre estudios realizados en Europa. Finalmente, con todo esto, se obtuvieron 15 artículos de los cuales se excluyeron tres de ellos por no guardar relación estricta con el tema a tratar (*Human Health and Ocean Pollution*, enfocado en el estudio de la contaminación acuática por otros contaminantes diferentes a los antibióticos como son los microplásticos y en la influencia de los mismos en el desarrollo de enfermedades crónicas como las patologías cardiovasculares, *Systematic Assessment of Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis Infections from 1911-2019: A Growth Analysis of Association with Human Autoimmune Diseases*, por tratar sobre la relación entre la Paraturberculosis y las enfermedades autoinmunes y *The effective design of sampling campaigns for emerging chemical and microbial contaminants in drinking water and its resources based on literature mining* porque sus objetivos estaban orientados a evaluar la eficacia de la selección de la literatura científica para dirigir campañas de muestreo con fines de alerta temprana y detectar nuevos contaminantes acuáticos de interés para la salud siendo en su mayoría sustancias diferentes a los antibióticos).

Durante la fase de búsqueda de la información se decidió seguir un determinado orden con los temas a abordar:

- 1) Etimología e historia de los antibióticos.
- 2) Mecanismos de acción de los antibióticos.
- 3) Mecanismos por los cuales las bacterias se hacen resistentes a los antibióticos.
- 4) Resistencia bacteriana y medioambiente.
- 5) Mecanismos de depuración de las aguas residuales en las Estaciones Depuradoras de Aguas Residuales (EDARs).

6) Influencia de las aguas residuales en la transmisión de bacterias resistentes y genes de resistencia a los antibióticos.

Una vez recogida toda la información sobre los temas a tratar en la revisión se procedió a la redacción de esta siguiendo el orden establecido en el índice.

4. RESULTADOS.

A continuación, se va a realizar una revisión sistemática cualitativa de los artículos encontrados y seleccionados durante la fase de búsqueda. El motivo de ello es que no todos estos estudios tienen una metodología ni unos objetivos comunes para realizar un análisis comparativo de los mismos. Sin embargo, todos cumplen nuestros criterios de inclusión y, de todos ellos podemos sacar una conclusión común para la realización del siguiente trabajo, cuyo objetivo principal, es dar respuesta a la siguiente pregunta de investigación: "¿Son las aguas residuales un reservorio y vehículo de transmisión de determinantes de resistencia a antibióticos?".

El primer estudio que se analizó es un estudio preliminar realizado en dos EDARs municipales y diferentes de Polonia (una situada en el norte y otra en el centro). Su objetivo principal era comparar la presencia de unos genes de resistencia a tetraciclina y sulfonamida concretos en muestras de afluentes y efluentes de dos EDARs diferentes, tanto en su tamaño como en los procesos biológicos aplicados en cada una de ellas para el tratamiento de las aguas residuales (en una de ellas se aplicaba un tratamiento convencional con lodos activados (AS) y en otra se combinaban lodos activados (AS) con humedades artificiales (AACC)). Los datos disponibles indican que Polonia tiene una de las tasas más altas de consumo total de antibióticos entre los países europeos, y las infecciones en los pacientes polacos demuestran una relación entre la utilización y los niveles de resistencia, concretamente, el elevado consumo de sulfametoxazol (la sulfonamida más frecuentemente consumida e identificada en las EDARs) acompañado de altos niveles de resistencia al mismo. Con el fin de examinar las posibles variaciones estacionales en la presencia de estos genes de resistencia se recolectaron las muestras a lo largo de cuatro temporadas en 2018 en el afluente y, en el efluente final de cada una de las depuradoras. Como resultado se obtuvo que, tanto la EDAR convencional, que emplea lodos activados (EDAR1), como la EDAR que combina lodos activados con humedades artificiales (EDAR2), contaban con la presencia de los 13 genes de resistencia a tetraciclinas y sulfonamidas seleccionados para la realización del estudio. Además, se apreció un enriquecimiento de los genes de resistencia del afluente al efluente, siendo este 10 veces mayor en la EDAR1 que en la EDAR2, lo que se puede explicar porque el tamaño de la primera es 20 veces superior al de la segunda y, como consecuencia, al poder albergar a un mayor número de antibióticos, puede ejercer una presión selectiva mayor sobre las bacterias resistentes, además, si la EDAR1 recibiese una cantidad considerable de aguas hospitalarias recibiría también una mayor cantidad de antibióticos que si solo recibiese aguas domésticas. Por lo tanto, se puede concluir que las EDARs que emplean únicamente tratamientos convencionales no son suficientes para eliminar los genes de resistencia a antibióticos y que, por lo tanto, los procesos biológicos pueden favorecer la propagación y selección de bacterias resistentes a antibióticos, así como la transferencia de genes de resistencia a los mismos. (24)

El segundo estudio que se analizó también se llevó a cabo en Polonia, pero en este caso se analizaron 16 EDARs municipales situadas en diferentes regiones y que contaban con

diferentes tecnologías de tratamiento (5 depuradoras biológicas con mayor regeneración de biogénicos, 5 depuradoras mecánicas y biológicas, 3 depuradoras biológicas, 2 depuradoras biológicas, físicas y químicas con mayor eliminación de biogénicos y 1 depuradora biológica con mayor remoción de biogénicos y con soporte químico del proceso de desfosfatación). Su objetivo principal era estudiar la exposición de los trabajadores de las plantas de tratamiento de aguas residuales a *Staphylococcus aureus*, incluido el *S. aureus* resistente a metilina (*MRSA*) y otras cepas resistentes a otros antibióticos. Para ello se recolectaron 33 muestras de aguas residuales (en cada EDAR se cogió una muestra de aguas residuales sin tratar y de aguas residuales ya tratadas y además, en una de ellas se obtuvo una muestra adicional de las aguas tras haber pasado el tratamiento mecánico) y, 253 muestras del aire del entorno de las 16 EDARs en 2 temporadas (primavera y verano). Como resultado se obtuvo que, en un 69% de las EDARs estudiadas había especies de *S. aureus* y, que, cuanto mayor era la temperatura, mayor era la presencia de estos microorganismos. Además, se vio que un porcentaje importante eran cepas resistentes solo a penicilina y otras, a múltiples antibióticos, muchos de ellos de gran importancia en el ámbito veterinario. Como conclusión de este estudio se obtuvo que las EDARs constituyen un papel significativo en la cadena de transmisión de genes de resistencia a los antibióticos en el medio ambiente y que los trabajadores de las EDARs están expuestos a *S. aureus*, incluido *MRSA* y otras cepas resistentes y multiresistentes convirtiéndose en portadores como consecuencia de su exposición ocupacional y transmitiendo las bacterias patógenas resistentes a sus hogares y también destaca la necesidad de tratar las aguas procedentes de la ganadería intensiva antes de que lleguen a las EDARs ya que estas parecen ser una gran fuente de *S. aureus*. (25)

El tercer estudio que se analizó es un estudio realizado en dos EDARs urbanas de Irlanda. Su objetivo principal era identificar el papel de las EDARs en la diseminación de ARB (bacterias resistentes a antibióticos) y ARG (genes de resistencia a antibióticos) al medio ambiente. Para ello se recolectaron muestras de los efluentes de las dos plantas de tratamiento de aguas residuales a estudio en dos temporadas durante dos años consecutivos (finales de primavera y principios de otoño de 2015 y 2016), y se cultivaron una serie de bacterias (coliformes fecales: *E. coli*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*) y posteriormente se determinaron los patrones de susceptibilidad de las mismas a 13 antibióticos seleccionados. También se realizaron pruebas fenotípicas para identificar los diferentes mecanismos de resistencia. Como resultado se obtuvieron distintos porcentajes de resistencia a diferentes antibióticos y diferentes mecanismos de resistencia. Como conclusión de este estudio se puede establecer que existe evidencia de que las aguas residuales ya tratadas están contaminadas por coliformes fecales resistentes y multiresistentes y que, además, cuentan con enterobacterias productoras de BLEEs y bacterias resistentes a la colistina y que, por lo tanto, suponen un punto de control potencial para reducir o detener el movimiento de bacterias y genes al medio ambiente desde afluentes procedentes de desechos humanos o animales. (26)

El cuarto estudio analizado se realizó en España. Su objetivo principal era estudiar la exposición ambiental a productos farmacéuticos y sus riesgos. Para ello se recolectaron un total de 57 muestras de agua superficial en 19 puntos del río Mijares (Teruel-Castellón) en tres campañas diferentes entre junio de 2018 y febrero de 2019 y se investigaron hasta 40 compuestos diferentes mediante un método objetivo cuantitativo realizando también un cribado de amplio alcance de fármacos y metabolitos. Como resultado se identificaron hasta 69 fármacos y 9 metabolitos de los cuales, los que ejercen una mayor toxicidad en

los ecosistemas acuáticos son los AINEs y los antibióticos y dentro de estos últimos, destaca la toxicidad ejercida por azitromicina, ciprofloxacino y claritromicina. Además, se encontró que cinco antibióticos superan su umbral de resistencia contribuyendo así a una mayor adquisición de genes de resistencia por parte de las bacterias ambientales. Por tanto, como conclusión se puede decir que, las aguas superficiales son muy vulnerables si las aguas residuales que se vierten a las mismas solamente se tratan con tratamientos convencionales ya que estos son insuficientes para eliminar de forma óptima los productos farmacéuticos, incluidos los antibióticos, presentes en las mismas en elevadas cantidades como consecuencia de un elevado consumo de estos por parte de la población. (27)

El quinto estudio que se analizó fue realizado en Italia. Su objetivo principal fue valorar el efecto de la descarga de aguas residuales urbanas sobre la cantidad de genes de resistencia (ARG) y *E. coli resistente a antibióticos (AR-E.coli)* en el último tramo de dos ríos italianos (Arrone y Tíber). Ambos ríos están situados en el centro de Italia y, ambos, desembocan en el mar Mediterráneo, a 20 km entre sí. Estos ríos difieren en tamaño y volumen de flujo. El Arrone es un río pequeño, que drena una zona rural con agricultura no intensiva y pastizales difusos, así como un pequeño pueblo (Fregene) en su último tramo. Por otro lado, el Tíber es un gran río que drena en su último tramo el área urbana de Roma. Para llevar a cabo el estudio se recolectaron muestras en diferentes puntos del último tramo de ambos ríos, antes y después de la desembocadura de la EDAR correspondiente a cada uno. También se tomaron muestras de agua de mar en las cercanías de la desembocadura de los ríos para evaluar el impacto de la contaminación del río en la orilla del mar. El motivo de esto fue que las playas recreativas están situadas cerca de la desembocadura de ambos ríos. Estas muestras se procesaron para detectar ARG a una serie de antibióticos seleccionados, así como cepas de *E. coli resistentes*, de las cuales se estudió su patrón de resistencia. Como resultado se obtuvo que, para todos los genes de resistencia estudiados, las concentraciones absolutas fueron significativamente más altas en el Tíber que en el Arrone, en todos los sitios en los que se llevó a cabo el muestreo. Esto fue así, independientemente de la fecha en la que se tomaron las muestras. Sin embargo, la prevalencia de ARG en comunidades bacterianas de ambos ríos, fue similar, aunque su concentración absoluta fue, por lo general, para la mayoría de ARG, mayor en los efluentes de las EDARs. Esto último sin diferencias significativas a lo largo de los diferentes tramos de los ríos estudiados. Como conclusión, se puede decir que, ambos ríos son una fuente de contaminación puntual o difusa de los efluentes de la EDAR. Además, pueden explicar un patrón de resistencia fenotípica de *E.coli* a tetraciclina y ciprofloxacino (presente de forma significativa en el Arrone, pero no en el Tíber). Por tanto, las EDARs urbanas son las fuentes puntuales de contaminación más comunes de los ríos. Esto afecta a la ecología de los mismos, Además, son una fuente de patógenos, incluidas las ARB, y de residuos de medicamentos, incluidos los antibióticos. Por todo esto son consideradas puntos críticos para la adquisición y propagación de ARB y ARG en las aguas receptoras. (28)

El sexto estudio que se analizó consiste en una investigación llevada a cabo en aguas residuales hospitalarias de República Checa y de Eslovaquia. Su principal objetivo era comparar la prevalencia de bacterias coliformes resistentes en aguas residuales de hospitales de Eslovaquia y de República Checa. Para ello, se recolectaron muestras de aguas residuales en el punto de salida de la canalización en centros de salud y hospitalarios de ambas de 2014 a 2017. En cada centro se tomaron dos muestras diferentes y para su análisis se tuvo en cuenta el número de camas, el tipo de equipo y el receptor

de las aguas residuales. En la mayor parte de los hospitales, las aguas residuales solo se nitrifican, mientras que, en cinco de ellos, se nitrifican y se cloran antes de conectarse a la red pública de alcantarillado. Como resultado se aislaron bacterias coliformes que mostraban resistencia a los antibióticos. La mayor cifra de bacterias multirresistentes se obtuvo en un hospital de República Checa. Además, se encontró que más de la mitad de las bacterias aisladas presentaban un fenotipo de resistencia a múltiples fármacos y una gran capacidad para crear biopelículas adheridas a las paredes del alcantarillado lo que aumenta la supervivencia y capacidad de multiplicación de estas bacterias, así como la diseminación de genes de resistencia a antibióticos por parte de las mismas y que el 42% de los aislamientos presentaban una sobreproducción de las bombas de eflujo. Por tanto, como consecuencia de los resultados obtenidos en este estudio, se puede decir que los efluentes hospitalarios son una fuente de bacterias multirresistentes, muchas de ellas productoras de BLEEs, que pueden transmitir sus genes de resistencia a otras bacterias en las plantas de tratamiento de las aguas residuales y que, por lo tanto, deberían ser mejor tratadas antes de ingresar al alcantarillado urbano. (29)

El séptimo de los estudios seleccionados para la realización de esta revisión es un estudio transnacional sobre bacterias coliformes resistentes a cefotaxima, en plantas de tratamiento de aguas residuales urbanas. Su objetivo principal fue desarrollar, probar y validar un enfoque de vigilancia de bajo costo y fácil de implementar para evaluar la resistencia a los antibióticos en plantas de tratamiento de aguas residuales, seleccionando bacterias coliformes resistentes a cefotaxima (CTX-R) como indicadores. El motivo de esta elección fue que, los métodos de identificación de estas son aceptados a nivel internacional como indicadores de contaminación fecal en aguas recreativas. Por lo tanto, son aplicados de forma rutinaria en los laboratorios. Además, los coliformes CTX-R son relevantes desde el punto de vista clínico ya que se asocian a la producción de betalactamasas de espectro extendido, las cuales son escasas en ambientes hostiles. Para ello analizaron 57 EDARs en 22 países de Europa (47 de las 57 EDARs analizadas), Asia, África, Australia y América del Norte. Para cada EDAR se tomaron muestras al azar (una muestra del afluente, después de la sedimentación primaria y otra, del efluente después del tratamiento biológico secundario y/o después de la desinfección) en dos campañas diferentes. La primera consistió en tomar tres muestras, una al mes, entre diciembre de 2016 y febrero de 2017. La segunda, en tomar dos muestras, entre mayo y octubre de 2017. Las muestras fueron procesadas el mismo día en el que se tomaron. De las 57 EDARs estudiadas, 54 aplicaron un tratamiento convencional con lodos activados y con sedimentación secundaria, 2 EDARs utilizaron biorreactores de membrana y una de ellas, empleó un filtro precolador. Como resultado de este estudio se vio que las bacterias coliformes resistentes a cefotaxima estaban presentes en las aguas residuales sin tratar de todos los países estudiados. Pese a ello, se vieron diferencias estadísticamente significativas entre unos países y otros. También se obtuvo que la cuantía de estas estaba relacionada con la temperatura de cada región. Además, este estudio vio que, a pesar de que el adecuado tratamiento de las aguas residuales fue capaz de reducir en gran medida la cantidad de coliformes CTX-R, en algún caso, se observó que persistían cifras superiores a 10^3 UFC/ml en los efluentes finales. Por lo tanto, se puede decir que las aguas residuales, aun siendo correctamente tratadas, son una fuente de bacterias resistentes a antibióticos y que, además, los coliformes CTX-R sirven para valorar el estado de resistencia a antibióticos de las aguas residuales. (30)

El octavo de los estudios analizados estudió aguas residuales urbanas en diez países europeos (Dinamarca, Grecia, Bélgica, Francia, Italia, Alemania, Suecia, España,

Finlandia y Noruega). Su objetivo principal fue evaluar la relación entre la prevalencia de resistencia a antibióticos en *E. coli* de aguas residuales y *E. coli* de muestras clínicas de estos países, los cuales cuentan con diferentes situaciones de resistencia según lo evaluado por la vigilancia clínica tradicional. Para ello se recolectaron muestras de 1L de las aguas residuales afluentes o sin tratar procedentes de las estaciones depuradoras de aguas residuales que abastecen a las principales ciudades de los diez países europeos a estudio (EDARs que prestan servicio a una población de > 500000 habitantes) entre diciembre de 2016 y diciembre de 2017. Estas plantas recibieron aguas residuales domésticas, industriales y hospitalarias (se desconoce el porcentaje que recibieron de cada una). Para las cepas de *E. coli* aisladas en las muestras se analizó la resistencia a seis clases de antibióticos (cuatro betalactámicos, un aminoglucósido y una fluoroquinolona) y se comparó la prevalencia de la misma en aguas residuales con la clínica informada por la Red Europea de Vigilancia de la Resistencia a los Antibióticos. Como resultado se obtuvo que la prevalencia de *E. coli* resistente para la mayor parte de los antibióticos estudiados fue mayor en el sur de Europa, seguido de Europa occidental y el norte de Europa y, que esta prevalencia fue menor en las aguas residuales que en la clínica, pero con tendencias similares. Como conclusión de este estudio se puede afirmar que el estudio de las aguas residuales es un método prometedor para generar datos de vigilancia que reflejen la prevalencia clínica de bacterias resistentes a antibióticos, sobre todo en países donde la vigilancia clínica es limitada en la actualidad ya que la tendencia en la cantidad de bacterias es similar. (31)

El noveno estudio es un estudio internacional realizado en Europa en los años 2015 y 2016. Este monitoreó 53 residuos de antibióticos pertenecientes a 10 clases terapéuticas diferentes (8 fluoroquinolonas, 4 quinolonas, 5 penicilinas, 6 cefalosporinas, 6 macrólidos, 4 tetraciclinas, 2 lincosamidas, 15 sulfonamidas, 1 inhibidor de la dihidrofolato reductasa y 2 nitroimidazoles) en el efluente final de 13 EDARs ubicadas en siete países europeos (Portugal, España, Irlanda, Chipre, Alemania, Finlandia y Noruega), 2 EDARs de cada país excepto de España y Noruega donde solamente se estudió una EDAR. Su principal objetivo era comprobar la existencia de residuos de antibióticos en las mismas y su impacto sobre el medio acuático, así como evaluar las tendencias geográficas y temporales sobre la presencia de estos contaminantes. Para ello se tomaron muestras durante 24h y tres días consecutivos (martes, miércoles y jueves) a principios de primavera y otoño durante dos años consecutivos (2015 y 2016) coincidiendo con los picos más altos (a principios de primavera) y más bajos (a principios de otoño) de consumo de antibióticos. Como resultado se obtuvo que los países con mayor concentración de antibióticos en los efluentes de las plantas de tratamiento de aguas residuales fueron Irlanda, Portugal y España mientras que países del norte como Noruega, Finlandia y Alemania, y Chipre, presentaban una concentración total más baja de los mismos. Los datos obtenidos en este estudio sobre las concentraciones totales de antibióticos en estos países se utilizaron a su vez para valorar el impacto de estas sobre las poblaciones microbianas de los sistemas acuáticos y la evolución de la resistencia a los antibióticos en estos medios. Para ello se emplearon la concentración ambiental pronosticada sin efecto y la concentración mínima inhibitoria de los antibióticos encontrados y valoraron el riesgo ambiental mediante el cociente de riesgo (RQ). De este modo se obtuvo que tres antibióticos como son el ciprofloxacino, la azitromicina y la cefalexina pueden actuar como marcadores de contaminación antimicrobiana de las aguas residuales ya que en algunas ocasiones pueden suponer un riesgo para el medio ambiente y el desarrollo de resistencias a los antibióticos. Como conclusión de este estudio se puede decir que existen residuos de antibióticos y muchos de ellos en grandes concentraciones

en los efluentes de las EDARs por lo que los mecanismos llevados a cabo en las mismas no son suficientes y pueden suponer un riesgo ambiental y por tanto, ser empleados como marcadores de contaminación antimicrobiana de las aguas residuales. (32)

El décimo estudio analizado fue un estudio realizado en Alemania cuyo objetivo principal era evaluar la diseminación de la resistencia a los antibióticos por los efluentes de las aguas residuales procedentes de EDARs con diferentes áreas de captación. Para ello se cuantificó la cantidad de genes de resistencia a antibióticos (ARG), de bacterias patógenas facultativas y de un elemento genético móvil del ADN en 23 efluentes diferentes en cuatro campañas de muestreo (de febrero a noviembre de 2018) y se clasificaron 12 ARG clínicamente relevantes en función de su frecuencia en las aguas residuales finales y se cuantificaron cinco bacterias patógenas facultativas: *E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii* y *enterococos*. Para analizar la cantidad de ARG y FPB (bacterias patógenas facultativas) vertidos diariamente por cada EDAR investigada, se calculó una suma de todos los ARG detectados para cada EDAR y se comparó con el volumen de efluente diario correspondiente de la EDAR. Como resultado se obtuvo que la cuantificación absoluta demostró que el espectro completo de genes de resistencia a antibióticos y dianas bacterianas patógenas facultativas pasó por las EDARs y se liberaron con los efluentes al medio ambiente independientemente de los tamaños y volúmenes diarios de descarga de aguas residuales de las plantas de tratamiento investigadas. Además, aunque las cantidades vertidas de los genes de resistencia y patógenos facultativos investigados entre los diferentes grupos de EDARs fueron comparables, el análisis de correlación de Pearson de las EDARs influenciadas por el hospital mostró una mayor abundancia de genes de resistencia clínicamente relevantes que se asocian con distintos patógenos. Como conclusión se puede decir que todos los efluentes de las EDARs contribuyeron al amplio espectro de ARG y de bacterias patógenas facultativas liberadas a los compartimentos receptores (sobre todo las hospitalarias) y, como consecuencia, las aguas receptoras conllevan un posible riesgo para la salud al colonizar a los humanos con estas bacterias. (33)

El undécimo de los estudios fue realizado en Conwy, en el norte de Gales y trató sobre la importancia de la concentración de sedimentos en la supervivencia de *E. coli resistente productora de bla_{CTX-M-15}* tras ser liberada a aguas receptoras procedente de aguas residuales. Su objetivo principal fue valorar el impacto de las concentraciones de sedimentos en la tasa de inactivación de *E.coli* tras su liberación desde las aguas residuales al estuario final y simular la dispersión de las mismas a zonas de playa y criaderos de mariscos mediante un modelo hidrodinámico. Para ello se tomaron muestras de agua dulce con *E. coli productora de bla_{CTX-M-15}* por triplicado a 15 cm por debajo de la superficie y a 200 m de distancia de la desembocadura de la EDAR y se clasificaron en función de su turbidez (baja, media y alta) que en el caso del agua dulce suele oscilar entre 50-500 FTU (unidades de turbidez de formacina). Como resultado se obtuvo que la exposición natural a radiación UV en la zona a estudio era insuficiente para erradicar a esta cepa de *E. coli* resistente tanto en las aguas residuales como estuarias tanto en invierno como en verano y, como consecuencia, estas aguas eran muy turbias debido al gran número de bacterias que sobreviven en ellas. Las concentraciones de *E. coli productora de bla_{CTX-M-15}* se fueron reduciendo conforme nos distanciábamos desde la fuente de descarga, pero a pesar de esto, un 30% de las mismas fueron capaces de dispersarse desde el estuario hasta la costa en aproximadamente 36h. En las zonas pesqueras y recreativas, las concentraciones de bacterias resistentes oscilaban entre 1,4 y 10% dependiendo de la distancia mar adentro y de las mareas siendo capaces de persistir

a este nivel durante más de una semana. Por lo tanto, como conclusión, podemos decir que las aguas residuales humanas transmiten bacterias resistentes y sus genes a aguas dulces suponiendo un riesgo para la salud humana, siendo este proceso influenciado por varios factores entre los que destaca la meteorología (a mayor turbidez del agua, como la que ocurre cuando hay tormenta o una baja radiación UV, mayor protección y, por lo tanto, mayor cantidad de *E. coli* en las aguas). (34)

El duodécimo, y último estudio analizado, se trata de un estudio llevado a cabo en Gotemburgo (Suecia) sobre los efectos de las aguas residuales municipales y hospitalarias en la transferencia horizontal de genes (HGT) ya que, como es bien sabido, este es un mecanismo de gran importancia en la transmisión de resistencias a los antibióticos y, en los sistemas de alcantarillado. Las bacterias humanas y ambientales se exponen a una gran cantidad de sustancias que aumentan la transferencia horizontal de genes de unas bacterias a otras y entre estas sustancias están los antimicrobianos. Para ello se midieron una serie de antibióticos, los más utilizados en Suecia (amoxicilina, azitromicina, bencilpenicilina, cefadroxil, cefotaxima, cefalexina, ciprofloxacino, claritromicina, clindamicina, eritromicina, metronidazol, nitrofurantoína, meropenem, norfloxilino, tetraciclinas y trimetoprim), y otros productos farmacéuticos en muestras de aguas residuales municipales y hospitalarias esterilizadas por filtro y se investigaron los efectos de las mezclas de sustancias presentes en estas muestras sobre la transferencia horizontal de genes, exponiendo a una gran cantidad de bacterias donantes con una cepa receptora de *E. coli* marcada. Las muestras de aguas residuales empleadas para el análisis de estas como posibles inductores de la transferencia horizontal de genes se recolectaron en 4 ocasiones entre octubre de 2018 y abril de 2019. Como resultado se obtuvo que la exposición a aguas residuales municipales no produce cambios detectables en las tasas de transferencia horizontal de genes, sin embargo, la exposición a aguas residuales hospitalarias sí que se asocia a una mayor cantidad de bacterias receptoras resistentes a sulfonamidas inducida por concentraciones subinhibitorias de tetraciclina por lo que estas sí que podrían estar implicadas en la aparición y diseminación de bacterias resistentes. Además, según esta investigación, pese a que las concentraciones de las sustancias estudiadas eran mayores en aguas residuales hospitalarias, ninguna de ellas explica de forma individual los efectos encontrados. En la mayor parte de los casos los elementos genéticos móviles eran plásmidos (la mayoría del grupo Inc_N) y se transmitió conjuntamente resistencia a varios antibióticos. Como conclusión de este estudio se puede decir que los datos no muestran evidencia de que los químicos presentes en las aguas residuales municipales estudiadas induzcan HGT. Aún así, la mayor cantidad de transconjugantes después de la exposición a las aguas residuales de los hospitales podría tener implicaciones para los riesgos de aparición y transmisión de bacterias resistentes. (35)

Tabla 2: Resumen de los estudios analizados para la realización de la revisión.

ESTUDIO	TÍTULO	PAÍSES	OBJETIVOS	METODOLOGÍA	RESULTADOS	CONCLUSIONES
1	<p><i>Identification of Selected Antibiotic Resistance Genes in Two Different Wastewater Treatment Plant Systems in Poland: A Preliminary Study</i></p> <p>(Identificación de genes de resistencia a antibióticos seleccionados en dos plantas de tratamiento de aguas residuales en Polonia: un estudio preliminar)</p>	Polonia	<p>Comparar la presencia y abundancia de 13 genes de resistencia seleccionados a tetraciclina (10 genes) y sulfonamida (3 genes) antes y después del proceso de depuración en dos estaciones de tratamiento de aguas residuales, diferentes en tamaño y tratamientos aplicados (uno convencional basado en AS otro combinando un método convencional basado en AS con CW).</p>	<p>Recolección de las muestras: se tomaron muestras del afluente y efluente de ambas EDARs en enero, abril, julio y octubre de 2018 y de los lodos activos (AS) para realizar un análisis cuantitativo de los ARG.</p> <p>Preparación de las muestras: las muestras anteriores se cogieron en botellas estériles, se transportaron al laboratorio y se almacenaron a 4°C. Aquí las muestras de afluentes y efluentes se filtraron usando filtros de microfibras de vidrio de 1.2 µm para eliminar contaminantes de mayor tamaño y luego, a través de filtros de membrana de ésteres de celulosa mixtos de 0.22 µm para retener todo el material biológico. A continuación, los filtros obtenidos se cortaron en trozos más pequeños, se transfirieron a tubos de centrifugado con un tapón de rosca de 15 ml con 6 ml de 1 x PBS y se agitaron durante 20 min (1000 rpm / min) a temperatura ambiente. Finalmente, los filtros se transfirieron a tubos limpios y se repitió el procedimiento con la nueva porción de PBS. Ambas suspensiones se combinaron y centrifugaron durante 10 min (8000 xg). Todos los precipitados obtenidos se almacenaron a -20 ° C.</p> <p>Aislamiento y purificación del ADN total en muestras de afluentes y efluentes: tras probar 10 kits de purificación de ADN disponibles comercialmente y seleccionar el método óptimo para el aislamiento y purificación del ADN de todas las muestras (<i>GeneMATRIX SOIL purification kit®</i>) se procedió a purificar todo el ADN de las muestras y, a continuación, todas las muestras de ADN purificadas se sometieron a análisis espectrofotométricos para determinar la concentración y pureza del ADN. Estas muestras de ADN se almacenaron a -20°C.</p>	<p>Evaluación de los kits de extracción del ADN total: los kits de extracción de ADN seleccionados para la prueba fueron evaluados según la conveniencia de su uso, el tiempo del proceso y el costo de un solo aislamiento. Teniendo en cuenta todos los criterios anteriores, se seleccionó el <i>kit de purificación de ADN GeneMATRIX SOIL</i> como el método óptimo para la extracción y purificación del ADN total de las muestras de EDAR y se utilizó para la realización de este estudio.</p> <p>Presencia y eliminación de los ARG en las EDARs: mediante un método de qPCR comparativo se detectaron los 13 genes de resistencia a tetraciclinas y sulfonamida seleccionados para la realización de este estudio, tanto en el afluente sin tratar como en el efluente de las EDARs estudiadas. Además, en general, se ha observado un aumento en la cantidad de ARG desde el afluente hasta el efluente siendo el enriquecimiento más significativo (más de 10 veces) para los genes tet (B, K, L, O) y sulIII. Por lo tanto, se observó un enriquecimiento de ARG en las EDARs siendo este mayor en la EDAR que solo emplea métodos convencionales.</p> <p>Cambios estacionales y ARG: aunque los resultados muestran un mayor enriquecimiento de ARG en determinadas épocas del año, no se observa una tendencia clara por la que los ARG seleccionados sufren fluctuaciones estacionales.</p>	<p>En la mayoría de los casos se mostró un enriquecimiento de los ARG seleccionados (10 que codifican resistencia a tetraciclina y 3 a sulfonamida) después de pasar por los procesos de tratamiento de aguas residuales y por lo tanto, las EDARs son puntos críticos para la propagación de determinantes de resistencia a los antibióticos en el medio ambiente.</p>

				<p>Análisis de los genes de resistencia a tetraciclinas y sulfonamidas seleccionados: para analizar los genes presentes en las muestras que codifican la resistencia a tetraciclinas y sulfonamidas se utilizó la <i>PCR cuantitativa</i>. Para ello se utilizó como gen de referencia para explicar la variabilidad de la cantidad total de bacterias en las muestras el gen de ARNr 16S y una serie de secuencias de cebadores. Los análisis de cada muestra se realizaron tres veces y, en cada ejecución, se incluyó 1 µL de agua libre de ADN microbiano como control negativo.</p>		
2	<p><i>Occupational exposure to Staphylococcus aureus in the wastewater treatment plants environment</i></p> <p>(Exposición ocupacional al <i>S. aureus</i> en las plantas de tratamiento de aguas residuales)</p>	Polonia	<p>Evaluar la exposición ocupacional a la bacteria <i>Staphylococcus aureus</i>, incluida la <i>S. aureus</i> resistente a la <i>meticilina</i> (MRSA) y otras cepas resistentes a los antibióticos en el entorno de las plantas de tratamiento de aguas residuales municipales (EDARs) y ver como varía esta exposición (si la hay) en función de parámetros microclimáticos y los diferentes tratamientos llevados a cabo en cada EDAR.</p>	<p>Recolección de las muestras: se tomaron 286 muestras, incluidas 253 del aire y 33 de aguas residuales, de las cuales 17 muestras se recolectaron de aguas residuales sin tratar y 16 de aguas residuales tratadas vertidas al medio ambiente, de 16 EDARs con diferentes tecnologías de tratamiento ubicadas en diferentes regiones de Polonia. Las muestras de aire se tomaron mediante el método de impacto con una toma de muestras de aire portátil de un paso que se desinfectaba antes de cada toma con etanol al 70%, trabajando con una tasa de flujo de 20 l / min durante 10 min, directamente sobre las placas con el medio de cultivo, y el método de filtración. utilizando los equipos de medición que constan de una bomba GilAir-5, con un filtro de gelatina de 37 mm de diámetro y poros de 3 µm a un caudal de 3 l / min durante 1,5-2 h. Los equipos de medición se calibraron antes de cada procedimiento de muestreo, utilizando un calibrador Gillibrator-2 con una alta precisión de medición ± 1% y los cabezales de las tomas de muestra de los aerosoles se desinfectaron con una solución de etanol al 70% antes de cada muestreo.</p> <p>Análisis microbiológico: el medio de cultivo utilizado en todas las etapas del análisis de</p>	<p>Parámetros microclimáticos y presencia de <i>S. aureus</i>: los resultados no muestran una relación entre la estación o el mes y la presencia de la bacteria <i>S. aureus</i>. Sin embargo, las temperaturas exteriores más altas pueden correlacionarse con la presencia de <i>S. aureus</i> en las EDARs analizadas y con la resistencia a los antibióticos que presenta la especie de forma que cuanto más alta es la temperatura en el exterior más EDARs cuentan con la presencia de <i>S. aureus</i> (presente con temperaturas por encima de 15 °C).</p>	<p>En general, los trabajadores de las EDAR están expuestos ocupacionalmente a <i>S. aureus</i>, incluido MRSA, y otras cepas resistentes. El mayor riesgo de infección está en las actividades que se realizan en contacto directo con aguas residuales o los dispositivos por los que fluyen las mismas, especialmente en la etapa de tratamiento mecánico. Una fuente importante de <i>S. aureus</i> parece ser la ganadería intensiva ubicada en el área de las EDARs analizadas.</p>

			<p>laboratorio fue el <i>sustrato cromogénico CHROMID® S. aureus Elite agar de bioMérieux</i>. Las muestras de bioaerosoles y aguas residuales en el medio de cultivo se incubaron a 37 ° C durante 48 h y se cuantificaron las colonias bacterianas crecidas en el medio dos veces, a las 24 y a las 48h de realizarse el cultivo. A continuación, se seleccionaron las colonias bacterianas que, según el patrón de crecimiento en el medio de cultivo, cumplían los criterios para la especie <i>S. aureus</i> (color rosa, superficie lisa, brillante y convexa) y se procedió a analizar la especie mediante métodos bioquímicos para valorar la producción de coagulasa (se eliminaron las cepas coagulasa negativas) y se identificaron las cepas coagulasa positivas mediante espectrometría de masas.</p> <p>Análisis de resistencia a antibióticos: se analizó la sensibilidad de los aislados de <i>S. aureus</i> a los antibióticos más frecuentemente empleados para el tratamiento de las infecciones causadas por estos gérmenes tanto en humanos como en animales utilizando un método automático, el sistema WalkAway y se analizó la resistencia de estas cepas a 21 antimicrobianos pertenecientes a 9 grupos de antibióticos diferentes.</p> <p>Medición de parámetros microclimáticos: en cada punto de recogida de las muestras se midieron la temperatura (T) [° C], la humedad relativa (RH) [%], la concentración de CO2 [ppm] y la velocidad del flujo de aire [m / s]. Estas mediciones se realizaron con un <i>microclimómetro multifuncional Testo 435-2</i>, equipado con 2 sondas conectables a una altura de 1,5 m sobre el suelo durante 10 min, y las lecturas se tomaron a intervalos de 1 min, y luego se promedió el resultado para cada punto de medición.</p>	<p>Es necesario desinfectar el vertido de aguas residuales en EDARs e incluir la exposición de los empleados de las plantas depuradoras a estas bacterias en la evaluación de riesgos laborales de las EDARs.</p>
--	--	--	--	---

3	<p><i>Antibiotic resistant and extended-spectrum β-lactamase producing faecal coliforms in wastewater treatment plant effluent.</i></p> <p><i>(Bacterias coliformes fecales resistentes a antibióticos y productoras de beta lactamasas en el efluente de las estaciones depuradoras de aguas residuales)</i></p>	Irlanda	<p>Comprobar la presencia de bacterias coliformes fecales resistentes y productoras de BLEEs en el efluente de dos EDARs de Irlanda e identificar el papel de las EDARs en la diseminación de ARB y ARG en el medio ambiente.</p>	<p>Recolección de las muestras: se tomaron muestras finales de los efluentes de dos EDAR urbanas de tamaño medio, con tratamiento terciario y una distancia entre ellas inferior a 100 km, en Irlanda, durante principios de primavera y finales de otoño en 2015 y 2016.</p> <p>Aislamiento de los coliformes fecales: las muestras se filtraron a través de membranas de nitrocelulosa y a continuación se incubaron en <i>Agar</i> a 37 °C durante 24h en presencia o ausencia de antibióticos (amoxicilina (32 mg / L), ciprofloxacino (1 mg / L) o tetraciclina (16 mg / L)) realizando por triplicado cada uno de los procedimientos.</p> <p>Pruebas de susceptibilidad a antibióticos: las bacterias aisladas se sometieron a pruebas de susceptibilidad antibiótica mediante <i>métodos de dilución en agar</i> y <i>difusión en disco</i>. Los antibióticos para los que se probó susceptibilidad fueron tetraciclina, amoxicilina, ampicilina, ciprofloxacina, kanamicina, gentamicina, colistina, cloranfenicol y trimetoprim y los discos empleados para medir esta susceptibilidad, imipenem (10 mg), meropenem (10 mg), cefotaxima (30 mg) y ceftazidima (30 mg). Para identificar a las ARB se utilizaron diferentes puntos de corte como la CMI y las cepas bacterianas resistentes a tres o más clases de antibióticos diferentes se definieron como multirresistentes. Los porcentajes de resistencia de las bacterias se calcularon como: <i>porcentaje (%) $\frac{1}{4}$ [(Número de coliformes fecales resistentes a un antibiótico / número total de coliformes fecales analizados) X 100]</i>.</p> <p>Identificación fenotípica de la producción de metalo-beta-lactamasa (MBL), BLEE y enzimas AmpC: las bacterias resistentes a imipenem y / o meropenem se sometieron a la <i>prueba de sinergia de doble disco Imipenem-EDTA</i>, los</p>	<p>Patrones de susceptibilidad a los antibióticos: en total, se aislaron 498 coliformes fecales de todas las muestras de efluentes de la EDAR, 226 en una y 272 en otra. Estos aislamientos se sometieron a pruebas de susceptibilidad antibiótica. Entre los antibióticos b-lactámicos probados, más del 90% de las bacterias aisladas de las dos EDAR fueron resistentes a amoxicilina y ampicilina y más del 20% fueron resistentes a cefotaxima o ceftazidima. La resistencia a los carbapenémicos se detectó en niveles relativamente más bajos. La resistencia a la colistina se encontró en un porcentaje más alto en el efluente de una de las EDARs. No hubo diferencias en la identificación de aislamientos resistentes a la colistina en las pruebas de susceptibilidad a antibióticos realizadas por diferentes métodos. Se detectaron coliformes fecales resistentes a múltiples fármacos (MDR) en aproximadamente el 50% del total de aislados analizados. La prevalencia de resistencia a otros antibióticos se encontró en niveles similares entre las dos EDAR.</p> <p>Detección de genes de resistencia a antibióticos: la <i>PCR multiplex de BLEE</i> reveló la presencia de <i>genes bla_{TEM}, bla_{SHV-12} y bla_{CTX-Mgroup1}</i> en 62 aislamientos y casi todos ellos eran <i>E. coli</i>. Sin embargo, pese a detectar aislamientos productores de MBL no se identificaron genes MBL conocidos mediante <i>PCR MBL multiplex</i> y lo mismo en el caso de aislamientos resistentes a colistina.</p>	<p>Las muestras de efluentes de dos EDAR demostraron la presencia de ARB y MDR, concretamente una cantidad relativamente alta de <i>Enterobacterias productoras de BLEE, carbapenémicas y resistentes a colistinas</i>. Aunque las bacterias eran fenotípicamente resistentes a la colistina o los carbapenémicos, no se detectaron mecanismos de resistencia móvil conocidos, a pesar de la capacidad de transferir el fenotipo de resistencia a través de la transformación. Estos hallazgos muestran que las coliformes fecales de los efluentes de las EDAR son fuentes de nuevos ARG que confieren resistencia a los antibióticos de última línea de defensa. Además, estas bacterias tienen una larga</p>
---	--	---------	---	---	---	---

				<p>aislamientos resistentes a cefotaxima y / o ceftazidima se sometieron a <i>pruebas de BLEE</i> y la producción de AmpC se determinó mediante la prueba del <i>disco de ácido fenil-borónico</i>.</p> <p>Identificación de genes de resistencia a antibióticos y especies bacterianas: las bacterias productoras de MBL (resistentes a carbapenémicos) se sometieron a <i>PCR multiplex</i> para identificar los genes de resistencia a carbapenémicos. Los aislamientos que mostraban un fenotipo BLEE positivo y eran fenotípicamente negativos para la producción de AmpC se analizaron más a fondo utilizando la <i>PCR multiplex BLEE</i>. También se analizaron mecanismos de resistencia a la colistina mediados por plásmidos para la identificación de genes <i>mcr-1</i>, 2, 3, 4 y 5. En cada caso se emplearon los cebadores correspondientes.</p> <p>Transferencia de plásmidos por transformación y tipificación de replicones: se extrajeron los plásmidos de aislamientos positivos para BLEE que llevaban los genes <i>bla_{TEM}</i>, <i>bla_{SHV}</i> y <i>bla_{CTX-M}</i> usando un kit de aislamiento de plásmidos y se transformaron en <i>E. coli DH5</i> por <i>choque térmico</i> y se seleccionaron en <i>agar LB suplementado con ampicilina (32 mg / L)</i>. La presencia en los transformantes de <i>E. coli</i> de los genes citados anteriormente se confirmaron mediante PCR y todos los transformantes se sometieron a pruebas de susceptibilidad antimicrobiana frente a imipenem, meropenem, ertapenem, ciprofloxacina, cloranfenicol, tetraciclina, amikacina, gentamicina, kanamicina, trimetoprim y colistina.</p>		<p>supervivencia en medio acuáticos. Por lo tanto, las EDARs son un punto de control potencial para reducir o detener el movimiento de bacterias y genes resistentes al medio ambiente desde otras fuentes como los desechos humanos o animales y por tanto, el uso de tecnologías de tratamiento adicionales en las EDARs pueden detener o reducir la cantidad de ARB y ARG que llegan a los efluentes finales.</p>
4	<i>Occurrence and ecological risks of pharmaceuticals in a</i>	España	Estudiar la exposición ambiental a productos farmacéuticos en el río Mijares (situado	<p>Recolección de las muestras: se tomaron muestras de agua en 19 puntos diferentes cubriendo casi todo el río Mijares, desde su nacimiento hasta su estuario. Para ello se seleccionaron varios sitios de muestreo: 4</p>	<p>Análisis cuantitativo por UHPLC-MS / MS (QqQ): los antibióticos claritromicina y roxitromicina mostraron recuperaciones insatisfactorias en algunos casos, especialmente en el nivel más alto de fortificación, probablemente porque su</p>	<p>Los vertidos de las EDARs en el río Mijares están contribuyendo a concentraciones</p>

<p><i>Mediterranean river in Eastern Spain</i></p> <p><i>(Presencia y riesgos ecológicos de productos farmacéuticos en un río del Mediterráneo en el este de España)</i></p>	<p>en la costa del Mediterráneo Oriental) y los riegos que esto supone tanto a nivel ecológico como para promover el desarrollo de resistencias a antibióticos.</p>	<p>EDARs, 2 plantas de tratamiento de residuos sólidos (ETAPs), varios embalses, puntos próximos a una piscifactoría, a una fábrica de fertilizantes. Para monitorizar a los productos farmacéuticos en diferentes períodos se llevaron a cabo tres campañas de toma de muestras: junio de 2018 (primera campaña, verano), septiembre de 2018 (segunda campaña, otoño) y febrero de 2019 (tercera campaña, invierno). En cada campaña, se recolectaron 19 muestras de agua superficial, una de cada punto de muestreo, en botellas de polietileno y se transportaron al laboratorio el mismo día (dentro de un máximo de 6 h) en contenedores isotérmicos refrigerados y se almacenaron a -20 ° C. hasta el análisis.</p> <p>Análisis de las muestras: para el análisis cuantitativo de las muestras se centrifugaron 2 ml de agua a 12.000 rpm durante 10 min. Posteriormente, se agregaron 50 µL de solución de mezcla de patrón interno marcado isotópicamente (ILIS) de 1 µg / L a 950 µL de la muestra de agua centrifugada (concentración final de ILIS en la muestra inyectada, 50 ng / L) y finalmente, se inyectaron 50 µl en el sistema UHPLC-MS / MS (sistema utilizado para realizar el análisis cuantitativo).</p> <p>Para el análisis del cribado se pasaron 100 ml de agua a través de un cartucho Oasis® HLB (150 mg). Después de la elución, el extracto se reconstituyó con 100 µL de metanol: agua (10:90, v / v) y se inyectaron 20 µL en el UHPLC-QTOF MS (sistema empleado para realizar el análisis de cribado cualitativo) mediante el cual se detectaron un gran número de microcontaminantes orgánicos.</p> <p>Evaluación de riesgos ecológicos: los efectos para los organismos acuáticos se calcularon en base al enfoque de distribuciones de sensibilidad de especies (SSD). La Fracción Potencialmente</p>	<p>analito-ILIS no estaba disponible y, por lo tanto, los efectos de la matriz no se pudieron corregir. Las recuperaciones insatisfactorias solo afectaron a ciprofloxacino y norfloxacino y, por lo tanto, esos valores deben tomarse como semicuantitativos. La razón podría ser la baja concentración de ILIS utilizada (50 ng / L).</p> <p>Análisis de muestras de agua superficial: un total de 57 muestras de agua de río (19 por campaña) fueron analizadas por LC-MS / MS (QqQ) para 40 productos farmacéuticos objetivo.</p> <p>Una cantidad notable de fármacos (66% de los compuestos detectados) superó, en al menos una de las muestras, el nivel de concentración de 0,1 µg / L (valor fijado por los países de la Unión Europea). Algunos de los fármacos detectados se encuentran actualmente incluidos en la <i>Watch List</i> de sustancias de seguimiento europeo en el ámbito de la política del agua (Comisión Europea, 2018), como los antibióticos ciprofloxacino, claritromicina, eritromicina y azitromicina.</p> <p>Variación estacional en la concentración de estas sustancias: no se observaron tendencias claras en función de la temporada de muestreo, aunque pareció ocurrir un ligero aumento en las concentraciones de antihipertensivos, antidepresivos, antibióticos y analgésicos en invierno (3er muestreo). Los antibióticos azitromicina, claritromicina y trimetoprima estuvieron presentes en concentraciones más altas en invierno en los tres sitios de muestreo y la clindamicina, eritromicina, sulfametoxazol y metronidazol en al menos dos de los tres sitios lo que se puede explicar por un mayor consumo de estos fármacos por parte de la población en esta época por la mayor incidencia de infecciones respiratorias o porque además, durante los períodos fríos, hay menos degradación de los compuestos en las EDARs debido a las bajas temperaturas y la irradiación, lo que resulta en</p>	<p>ambientales de antibióticos que pueden favorecer el enriquecimiento de genes de resistencia en las comunidades de bacterias acuáticas. Por tanto, los antibióticos en la Lista de Vigilancia de la UE (y otros que concurren con ellos) deben ser evaluados, no solo con respecto a sus posibles efectos secundarios tóxicos para los ecosistemas acuáticos, sino también con respecto a su contribución a la resistencia a los antibióticos en el medio ambiente. Además, de los fármacos que contribuyen a una mayor toxicidad (analgésicos/antiinflamatorios y antibióticos) solo tres de ellos están incluidos actualmente en la Lista de vigilancia de la UE y, de los 13 compuestos antibióticos evaluados en este</p>
--	---	---	--	---

				<p>Afectada (PAF) se calculó para compuestos individuales, y la Fracción Potencialmente Afectada de múltiples sustancias (msPAF), para mezclas contaminantes. Los productos farmacéuticos controlados se clasificaron en once clases terapéuticas (CT). Luego, se calculó la presión tóxica de los compuestos dentro de cada uno de los TC y sus mezclas para cada muestra. Primero, se calculó la Unidad de Riesgo (UH) para cada compuesto en cada sitio de muestreo dividiendo el logaritmo de la concentración medida por el SSD μ. Estas HU se utilizan para ajustar las diferencias en la potencia de los compuestos evaluados. A continuación, se utilizó el modelo de adición de concentración para calcular el msPAF correspondiente a cada TC (msPAFTC) en cada muestra utilizando la función Microsoft Excel.</p> <p>Evaluación de los riesgos de promover la resistencia a los antibióticos en bacterias ambientales: se calcularon utilizando las <i>Concentraciones Previsibles sin Efecto (PNEC) de resistencia</i> propuestas por <i>Bengtsson-Palme y Larsson (2016)</i> para todos los antibióticos evaluados excepto furaltadona, ácido oxolínico y sulfadiazina, para los cuales la los PNEC no están disponibles. Los cocientes de riesgo (RQ) se calcularon sumergiendo las concentraciones de antibiótico medidas por las PNEC, de modo que un cociente de RQ mayor que uno indica un riesgo potencial de desarrollo de resistencia a los antibióticos.</p>	<p>niveles más altos de concentración de estas sustancias en las aguas residuales efluentes y, por lo tanto, en las aguas superficiales receptoras.</p> <p>Cribado de los productos farmacéuticos y sus metabolitos: con el fin de completar los datos cuantitativos obtenidos en la primera campaña y poder identificar otros compuestos presentes en las muestras, se realizó un análisis cualitativo empleando el <i>sistema UHPLC-QTOF MS</i> a las muestras recolectadas en la segunda campaña. En total, se detectaron 41 productos farmacéuticos y hasta 35 se confirmaron con estándares de referencia. El mayor número de fármacos se obtuvo en las muestras de aguas obtenidas de las EDARs en las que los antihipertensivos y los antiinflamatorios no esteroideos (AINE) fueron los que se detectaron con mayor frecuencia, representando cada uno el 20% de los hallazgos, seguidos de los antibióticos (12%).</p> <p>Riesgos ecológicos: se calcularon los riesgos ecológicos utilizando un método basado en los SSD y los msPAF (presión tóxica de mezcla). Según esto hay zonas del muestreo expuestas a una msPAFTotal baja (por debajo del 5%) mientras que hay zonas con una msPAFTotal moderada (entre 5-25%) y zonas con una msPAFTotal alta (por encima de 25%) correspondientes a las muestras obtenidas de las EDARs.</p> <p>Riesgos de resistencia a antibióticos: se calcularon RQs superiores al valor de 1 en 3 de los 19 sitios de muestreo evaluados del río Mijares coincidiendo con las muestras correspondientes a las EDARs. Las PNEC de resistencia fueron superadas por cinco antibióticos siendo ciprofloxacino el compuesto con mayor RQ (17.3), seguido de azitromicina (6.5), norfloxacino (1.9), trimetoprim (1.5) y claritromicina (1.3).). En algunas muestras, se superaron los umbrales de resistencia para más de un antibiótico (por ejemplo, ciprofloxacino y norfloxacino;</p>	<p>estudio, se encontró que 5 superaban las concentraciones umbral para la resistencia a los antibióticos, particularmente en los sitios de muestreo aguas abajo de las descargas de las plantas de tratamiento de aguas residuales.</p>
--	--	--	--	--	--	--

					azitromicina y claritromicina), En general, los antibióticos con mayor riesgo de desarrollo de resistencia pertenecen a las clases de uoroquinolonas y macrólidos, que se clasifican como antibióticos de importancia crítica para la salud humana (OMS, 2019).	
5	<p><i>Effect of Urban Wastewater Discharge on the Abundance of Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic-Resistant Escherichia coli in Two Italian Rivers</i></p> <p>(Efectos de la descarga de aguas residuales urbanas sobre la cantidad de genes de resistencia a antibióticos y <i>E. coli</i> resistente a antibióticos en dos ríos italianos)</p>	Italia	<p>Estudiar el impacto que tiene la descarga del efluente de las EDARs urbanas sobre la cantidad de genes de resistencia a antibióticos y <i>E. coli</i> resistente a antibióticos en el último tramo de dos ríos situados en el centro de Italia (Arrone y Tiber) y que difieren en tamaño y volumen de flujo.</p>	<p>Recolección de las muestras: se tomaron muestras en diferentes puntos (1 km antes, 1 km después del punto de descarga de la EDAR correspondiente y en algún punto del mar próximo a la desembocadura de cada río) en el último tramo de los ríos Arrone y Tiber, ambos situados en el centro de Italia, próximos a la ciudad de Roma, con desembocadura en el mar Mediterráneo y distanciados 20 km entre sí. La EDAR que descarga en Arrone recoge aguas residuales de la ciudad de Fregene y trata aguas residuales de hasta 76.000 habitantes equivalentes (PE) en verano mientras que la EDAR que descarga en el Tiber recoge las aguas residuales del casco urbano de Ostia con aproximadamente 350.000 habitantes siendo su descarga media mayor que la anterior. Cada muestra se tomó por triplicado utilizando botellas de borosilicato de 1000 ml estériles, en los cuatro sitios, en tres fechas diferentes (septiembre de 2016, diciembre de 2016, abril de 2017). Las muestras recolectadas se colocaron en hieleras portátiles a 0 °C y se transportaron al laboratorio para su procesamiento dentro de las 3 h posteriores a la recolección.</p> <p>Cuantificación de los AGR en las muestras: de cada muestra de agua, se filtraron 200 ml a través de membranas de policarbonato de 0,2 µm y se congelaron para la posterior cuantificación de ARG mediante PCR cuantitativa (qPCR). Los genes estudiados fueron los genes que codifican resistencia a betalactámicos (bla_{TEM}),</p>	<p>Concentración de genes de biomarcadores y AGR: para todos los genes estudiados, las concentraciones absolutas fueron significativamente más altas en el Tiber que en el Arrone en todos los sitios de muestreo, a pesar de su fecha de recolección, lo que refleja claramente las diferencias entre ambos sistemas, a excepción del gen sul1, que no mostró diferencias en cantidad en todos los sitios fluviales, solo en el mar. Sin embargo, cuando se compararon sus concentraciones relativas solo los genes erm_B y qnr_S mostraron diferencias significativas en las muestras recolectadas 1 km antes de la desembocadura de la EDAR en el Tiber. La prevalencia de todos los genes medidos, excepto el gen qnr_S fue similar en los efluentes de las EDAR que descargan en el Arrone y el Tiber. La cantidad de bacterias no mostró diferencias significativas entre los sitios de muestreo en ambos ríos.</p> <p>Cantidad de <i>E. coli</i> y patrones fenotípicos de resistencia a antibióticos en los aislados de la misma: en general, la concentración de <i>E. coli</i> en el Tiber fue de 2 a 72 veces mayor que en el Arrone. Se encontró resistencia a al menos un antibiótico en más del 50% de los aislamientos de <i>E. coli</i>, excepto en la muestra tomada a 1km de la descarga de la EDAR del Arrone. La resistencia más frecuente de los aislados de <i>E. coli</i> fue para tetraciclina, amoxicilina, trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y cloranfenicol, mientras que la resistencia a</p>	<p>En ambos ríos, fuentes de contaminación difusa o puntual distintas de los efluentes de la EDAR estudiados pueden explicar el patrón de resistencia observado, aunque el Arrone aparece como más sensible al impacto de las aguas residuales considerando su menor caudal. Las EDARs urbanas son las fuentes de contaminación más comunes en los ríos y sus efectos en varios aspectos de la ecología de los ríos son bien conocidos. También son una fuente de patógenos, incluidos los ARB, y de residuos de medicamentos, incluidos los antibióticos por lo que se consideran puntos críticos para</p>

				<p>fluoroquinolonas (qnr_s), sulfonamidas (sul₁), tetraciclinas (tet_w) y macrólidos (erm_B) y dos genes como biomarcadores de la cantidad de bacterias: ARNr 16S e int11.</p> <p>Cuantificación de <i>E. coli</i> y de bacterias heterótrofas totales: la cantidad de <i>E. coli</i> cultivable se evaluó utilizando procedimientos estándar de filtración por membrana. Para ello se pasaron diluciones en serie de 10 veces de las muestras de agua recolectadas a través de filtros de nitrocelulosa de 0,45 µm y luego estos filtros se colocaron en placas que contenían <i>triptona bilis X-glucuronido (TBX)</i> que se incubaron a 44 °C durante 24 h. Luego se seleccionaron entre 10 y 30 colonias cultivadas en las placas TBX y se utilizaron para inocular <i>sistemas API-20E (Biomérieux)</i> de acuerdo con las instrucciones del fabricante para confirmar su identificación como <i>E. coli</i> y, aproximadamente 10-30 aislados de <i>E. coli</i> por muestra se almacenaron a -80°C en caldo de infusión de cerebro y corazón que contenía un 40% de glicerol para la posterior determinación fenotípica de la resistencia.</p> <p>Resistencia fenotípica a antibióticos de las <i>E. coli</i> aisladas: mediante difusión de disco se determinó la resistencia de los aislados de <i>E. coli</i> a una serie de antibióticos seleccionados previamente (tetraciclina (16 µg), imipenem (10 µg), cloranfenicol (30 µg), ciprofloxacino (5 µg), trimetoprim-sulfametoxazol (64 µg), amoxicilina (2 µg), AUG2 (amoxicilina / clavulánico). Ácido clavulánico 20/10 µg), gentamicina (10 µg), cefotaxima (5 µg).).</p>	<p>imipenem, amoxicilina, ácido clavulánico, gentamicina y cefotaxima fue menos frecuente. En el Arrone se vio que la resistencia a tetraciclina y ciprofloxacino era mucho mayor en las muestras tomadas a 1 km de la descarga de la EDAR y en la desembocadura del río con respecto a la muestra tomada 1 km antes de la descarga de la EDAR (efecto de sitio significativo), sin embargo, en el Tíber no se apreció este efecto.</p>	<p>la adquisición y propagación de ARB y ARG en las aguas receptoras. Además, la <i>E. coli</i> patógena también suele aparecer en los efluentes de las EDAR y se enriquece en los ríos que reciben descargas de efluentes de aguas residuales.</p>
6	<i>Hospital Wastewater-Important Source of Multidrug Resistant Coliform</i>	Eslovaquia y República Checa	Comparar la prevalencia de bacterias coliformes resistentes a antibióticos en los efluentes de aguas residuales	<p>Recolección de las muestras: se tomaron dos muestras diferentes de aguas residuales en cada uno de los puntos de salida de la canalización de diferentes centros hospitalarios ubicados en Eslovaquia y República Checa entre 2014 y 2017. Todos estos hospitales emplean únicamente nitrificación para el tratamiento de sus aguas</p>	<p>Aparición de bacterias coliformes resistentes a antibióticos en aguas residuales de instalaciones sanitarias: los resultados demuestran que los tratamientos convencionales de las aguas residuales hospitalarias son insuficientes para eliminar ARG y ARB e incluso podrían aumentar la cantidad de ciertos ARG en las aguas residuales</p>	<p>El entorno hospitalario y sus aguas residuales son un motivo de gran preocupación en el desarrollo y diseminación de la</p>

<p><i>Bacteria with ESBL-Production</i></p> <p>(Aguas residuales hospitalarias: una Fuente importante de bacterias coliformes fecales multirresistentes y productoras de BLEEs)</p>	<p>hospitalarias de Eslovaquia y de República Checa.</p>	<p>residuales excepto 5 de ellos que emplean también cloración.</p> <p>Aislamiento e identificación de bacterias coliformes resistentes: mediante el <i>método de placa en estrías en agar Mueller Hinton</i> se aislaron bacterias coliformes resistentes a una serie de antibióticos (ampicilina, gentamicina, ciprofloxacino, cloranfericol y tetraciclina) y se incubaron a 37°C durante 24 h. Después de obtener colonias separadas de los cultivos puros se identificaron mediante un espectrómetro de masas por desorción / ionización láser asistida por matriz / tiempo de vuelo (MALDI-TOF).</p> <p>Detección de la susceptibilidad a antibióticos: en las bacterias coliformes resistentes (excepto <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i>) se empleó el método de macrodilución mientras que en <i>E. coli</i> y <i>Klebsiella</i> (productoras frecuentes de BLEEs) se utilizó un ensayo en placa de microtitulación. Para detectar la producción de BLEEs se utilizó una prueba de sinergia de doble disco mediante la cual, para cada caso aislado se prepararon un par de placas de agar con o sin oxacilina y se inocularon con suspensiones bacterianas preparadas mediante bastoncillos de algodón estériles sobre los que se aplicaron los discos ATB de amoxicilina / ácido clavulánico (AMC), AZT, CAZ, CTX y CEP y después del cultivo durante 24 h 37 ° C, se observó el crecimiento de zonas inhibitoras alrededor de los discos de ATB aplicados.</p> <p>Para la detección de sobreproducción de bombas de eflujo se empleo el método de rueda de carro con placas de agar con bromuro de etidio.</p> <p>También se llevó a cabo un ensayo para la detección de biopelículas usando un lector de placas.</p> <p>Detección de genes de resistencia a antibióticos: para la detección de genes BLEE se emplearon ensayos de PCR multiplex y de PCR</p>	<p>que se vierten al medio ambiente. Se detectó resistencia de bacterias coliformes frente a cinco tipos de ATB de diferentes clases, incluidos β-lactámicos, aminoglucósidos, fluoroquinolonas, anfenoles y tetraciclinas además de una alta prevalencia de bacterias coliformes con fenotipo MDR.</p> <p>Susceptibilidad de las bacterias coliformes aisladas a antibióticos: se aislaron 35 cepas de bacterias coliformes resistentes a ATB de dos muestras de efluentes hospitalarios y la mayoría se identificaron como <i>E. coli</i> (54%) seguida de <i>Lelliottia amnigena</i> (17%), <i>Citrobacter freundii</i> (14%) y <i>Enterobacter cloacae</i> (6%). Más del 50% de los aislamientos de <i>E. coli</i> fueron resistentes a 11 ATB probados y hasta el 70% de los coliformes aislados eran MDR.</p> <p>Mecanismos de resistencia a los antibióticos seleccionados en bacterias aisladas: la sobreproducción de bombas de eflujo es la razón más común de la resistencia cruzada a diferentes ATB.</p> <p>La mayoría de los aislamientos se caracterizó por la presencia del gen tet_A mientras que la mitad de estos aislamientos contenían también el gen tet_E. Las bacterias gramnegativas que portan múltiples genes bla son muy frecuentes, y cada vez más, en las aguas residuales hospitalarias.</p> <p>Capacidad de las bacterias resistentes aisladas para formar biopelículas: se observó la formación de biopelículas en todas las bacterias aisladas en los efluentes hospitalarios.</p>	<p>resistencia a los antibióticos. Este estudio demuestra que las aguas residuales procedentes de centros de salud y hospitales de Eslovaquia y de República Checa contienen una gran cantidad de bacterias coliformes resistentes a los antibióticos con un fenotipo de multirresistencia (MDR). La mayoría de las bacterias aisladas cuentan con varios AGR diferentes y varios mecanismos de resistencia como una sobreexposición de bombas de eflujo y producción de BLEEs por lo que se los pueden transferir a bacterias ambientales difundiéndose así la resistencia en el medio ambiente. Además, la mayoría de las bacterias aisladas son productoras de biopelículas las cuales les facilitan</p>
---	--	---	--	---

				único mientras que para la detección de genes Tet (Tet _a y Tet _e) se utilizaron solo ensayos de PCR multiplex. Para ello se prepararon previamente las muestras de acuerdo a una serie de condiciones de temperatura, etc.		sobrevivir, multiplicarse y difundir AGR adheridas a los sistemas de alcantarillado.
7	<p>A global multinational survey of cefotaxime-resistant coliforms in urban wastewater treatment plants</p> <p>(Un estudio multinacional sobre bacterias coliformes resistentes a cefotaxima en estaciones depuradoras de aguas residuales urbanas)</p>	22 países de Europa, Asia, África, Australia y América del Norte.	Desarrollar, validar y probar un enfoque de vigilancia de bajo costo y fácil de implementar para evaluar la resistencia a los antibióticos en plantas de tratamiento de aguas residuales seleccionando a bacterias coliformes resistentes a cefotaxima (CTX-R) como indicadores	<p>Recolección de las muestras: se tomaron muestras de las aguas residuales sin tratar y después de la sedimentación primaria, y de los efluentes después del tratamiento biológico secundario de un total de 57 EDAR de 22 países estando la mayoría (47 de 57) ubicadas en Europa, una en África, seis en Asia, una en Australia y dos EDAR en América del Norte. Para cada EDAR, se tomaron muestras al azar en dos campañas: la primera consistió en tres fechas de muestreo, una vez al mes, entre diciembre de 2016 y febrero de 2017 y para la segunda campaña, se eligieron dos fechas de muestreo entre mayo y octubre de 2017.</p> <p>54 EDARs aplicaron lodos activados convencionales (CAS) con sedimentación secundaria, dos EDAR utilizaron biorreactores de membrana (MBR) y una empleó tecnologías de tratamiento con filtro percolador (TF) y en 22 EDARs se aplicaron distintos procesos de desinfección utilizando cloración (n = 7), radiación UV (n = 11), cloración y radiación UV (n = 1), filtración por membranas (n = 2) u ozonización (n = 1). Tres tratamientos de EDAR aplicaron el proceso de desinfección estacionalmente, dos utilizaron radiación UV en verano y uno cloración en invierno.</p> <p>Cuantificación de las bacterias: para ello se prepararon placas de agar de membrana para coliformes fecales complementada con sal sódica de cefotaxima a una concentración basada en los niveles de punto de corte de concentración inhibitoria mínima (MIC) para <i>Enterobacteriaceae</i>.</p>	<p>Abundancia de coliformes CTX-R en aguas residuales sin tratar: destacan la ubicuidad de los coliformes CTX-R en las aguas residuales sin tratar como la distribución geográfica altamente desigual de este fenotipo de resistencia. Estas variaciones pueden deberse a una gran variedad de factores, como el uso de antibióticos, las condiciones sanitarias y varios factores abióticos e incluso el clima.</p> <p>Tanto los coliformes totales como los CTX-R fueron más abundantes en afluentes de EDARs de zonas con temperaturas más elevadas.</p> <p>Eliminación de coliformes CTX-R en las EDARs: se evaluó en aquellas EDARs en las que se disponía de muestras de afluentes y efluentes. En general, de todas las fechas de muestreo, se compararon un total de 220 valores de recuento de coliformes y 215 valores de recuento de coliformes CTX-R entre afluentes y efluentes. Los tratamientos con MBR mostraron una capacidad de eliminación de coliformes significativamente mayor en comparación con los tratamientos con CAS.</p> <p>En un 35% de las 7 EDARs que incluían un paso de desinfección final se detectaron coliformes CTX-R en el efluente final.</p> <p>En general, no se observaron diferencias significativas entre los grupos después del tratamiento biológico secundario; sin embargo, en ubicaciones geográficas donde la temperatura estaba por debajo de 5 ° C, se identificó un mayor número de EDARs con eficiencias de eliminación de <95% de coliformes resistentes.</p> <p>Coliformes CTX-R en los efluentes finales: los resultados fueron muy variables y el análisis de las</p>	<p>En las EDARs hay bacterias resistentes y genes de resistencia a antibióticos y la capacidad de eliminación de estos depende de los métodos aplicados en cada planta depuradora.</p> <p>Este estudio muestra claros patrones de distribución geográfica de coliformes CTX-R en el efluente de las EDARs, sin embargo, los factores responsables de esto no están del todo claros por lo que son necesarios estudios más concretos.</p> <p>Monitorizar coliformes CTX-R es un enfoque factible y asequible para evaluar el estado de resistencia a antibióticos de las aguas residuales.</p>

					muestras de efluentes con recuentos altos de coliformes CTX-R no reveló tendencias geográficas notables, lo que sugiere que estos valores pueden depender de las características y el rendimiento de las EDARs locales.	
8	<p><i>Surveillance of antibiotic resistant Escherichia coli in human populations through urban wastewater in ten European countries</i></p> <p>(Vigilancia de <i>E.coli</i> resistente a antibióticos en poblaciones urbanas de diez países europeos)</p>	Dinamarca, Noruega, Grecia, España, Finlandia, Suecia, Alemania, Francia, Italia y Bélgica.	Evaluar la relación entre la prevalencia de <i>E. coli</i> resistente a antibióticos en aguas residuales y en muestras clínicas mediante un estudio en países con diferentes situaciones de resistencia según lo evaluado por la vigilancia clínica tradicional.	<p>Recolección de las muestras: se tomaron muestras de 10 grandes EDARs de 10 grandes ciudades europeas pertenecientes a diferentes países las cuales atienden a una población mayor de 500000 personas, entre diciembre de 2016 y diciembre de 2017. Se recolectaron muestras de 1l del afluente de estas plantas depuradoras mediante equipos de muestreo automáticos que permitieron hacer un submuestreo durante 24h. Las muestras se enfriaron durante el transporte y se procesaron aproximadamente 12 h después de la recolección.</p> <p>Cuantificación de las bacterias: se agitaron las muestras de 1l anteriores y se tomaron 25ml de cada una, que se homogeneizaron agitando con perlas de placas para romper cualquier material que pudiera contener grupos de bacterias. Se prepararon diluciones en serie de esta submuestra en cloruro de sodio al 0,85% y se sembraron 100ml de estas diluciones en diferentes tipos de placas, tanto para seleccionar <i>E. coli</i> como <i>E. coli</i> productoras de BLEEs y se incubaron durante la noche (16-20 h) a 37 ° C y 6 días a temperatura ambiente.</p> <p>Identificación y análisis de <i>E. coli</i>: de las cepas identificadas en las placas citadas anteriormente se seleccionó un número determinado de las mismas representativo para cada país y los aislados se almacenaron posteriormente a 20 ° C en caldo LB con glicerol al 20%. Todos los aislamientos recogidos se sometieron a una identificación confirmatoria de especies utilizando MALDI-TOF MS. Se analizó la resistencia a seis antibióticos en concentraciones de punto de corte clínico que</p>	<p>Abundancia de bacterias en aguas residuales y aislamientos de <i>E. coli</i>: el número total de bacterias en las aguas residuales muestreadas varió en función de la muestra y la fecha de recogida. La prevalencia de resistencia para ciprofloxacino fue del 6.2% a 7% para 1 mg / L y 0.5 mg / L, respectivamente lo que no fue significativo. El porcentaje de cepas que fue susceptible a todos los antibióticos probados varió entre el 60,3% en España y el 79,8% en Finlandia. La prevalencia de resistencia a ampicilina fue mayor que la prevalencia de ciprofloxacina, cefotaxima y / o ceftazidima, o resistencia a gentamicina en todos los países. En Suecia, Bélgica, Francia, Grecia, Italia y España, la prevalencia de resistencia a ciprofloxacina fue significativamente más alta (p <0,05) que la resistencia a cefotaxima y / o ceftazidima o gentamicina, mientras que en Dinamarca, Finlandia, Noruega y Alemania no hubo diferencia significativa (p> 0,05) en la resistencia a estos tres antibióticos. Se encontró resistencia a la colistina en aislamientos de Dinamarca, Noruega, Alemania, Francia, Grecia e Italia. Se encontró resistencia al meropenem en un único aislado de <i>E. coli</i> de Finlandia, que también era resistente a ampicilina, cefotaxima, ceftazidima y ciprofloxacina, pero no a gentamicina o colistina. Los porcentajes de los aislados de <i>E. coli</i> resistentes a cefalosporinas de tercera generación obtenidos mediante cribado en caldo con cefotaxima y ceftazidima fueron similares a los porcentajes de <i>E. coli</i> presuntamente productora</p>	Este estudio demuestra relaciones significativas entre la proporción de <i>E. coli</i> resistente en muestras de aguas residuales en muestras clínicas. Por lo tanto, como las aguas residuales son portadoras de bacterias resistentes, el monitoreo de estas podría usarse para predecir los niveles de resistencia clínica, que a su vez podrían ayudar a guiar el uso de antibióticos y el manejo de la resistencia.

				<p>incluyeron cuatro betalactámicos, un aminoglucósido y una fluoroquinolona comparando los resultados con los datos de resistencia clínica informados a EARS-net.</p>	<p>de BLEE obtenidos mediante placa selectiva en medios con cefpodoxima y cloxacilina. La prevalencia de la resistencia a la ampicilina fue significativamente diferente entre las regiones con una resistencia del 19,7% en el norte de Europa (Finlandia, Dinamarca, Noruega, Suecia), 26,4 % de resistencia en Europa occidental (Alemania, Francia, Bélgica) y 30,6% de resistencia en el sur de Europa (Grecia, Italia, España) y lo mismo ocurrió con la resistencia a ciprofloxacino y gentamicina, pero no con la resistencia a cefotaxima y/o ceftazidima.</p> <p>Comparación de porcentajes de E. coli resistente en muestras clínicas y de aguas residuales: al igual que en las muestras de aguas residuales, la prevalencia de la resistencia a la aminopenicilina en E. coli de muestras clínicas fue la más alta en todos los países, seguida de la resistencia a las fluoroquinolonas.</p> <p>La prevalencia de la resistencia a cefalosporinas de tercera generación y a aminoglucósidos en muestras clínicas no fue diferente en Dinamarca, Noruega, Grecia y España.</p> <p>Al igual de lo ocurrió con las muestras de aguas residuales, la resistencia en las muestras clínicas a aminopenicilina, aminoglucósidos y fluoroquinolonas variaron en función de las regiones europeas y en el caso de las muestras también ocurrió esto con las fluoroquinolonas.</p> <p>Para todas estas clases de antibióticos analizados, la prevalencia de resistencia fue menor en los aislados de las aguas residuales que en las muestras clínicas.</p>	
9	<p><i>Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact</i></p>	<p>Portugal, España, Irlanda, Chipre, Alemania, Finlandia y Noruega.</p>	<p>Proporcionar una visión general de la presencia y concentración de antibióticos en los efluentes finales de las EDAR ubicadas en</p>	<p>Recolección de las muestras: se tomaron en cuatro campañas: a principios de primavera de 2016 y 2017 y a principios de otoño de 2016 y 2017 (coincidiendo con los picos más altos y bajos del consumo de antibióticos) del efluente final de 13 EDARs urbanas de 7 países europeos (en todos los países se muestrearon 2 EDARs</p>	<p>Presencia de residuos de antibióticos en aguas residuales tratadas en diferentes países europeos: de los 53 compuestos antibióticos analizados en los efluentes de aguas residuales se detectaron 17 en al menos una de las 13 EDARs urbanas estudiadas, ubicadas 7 países diferentes.</p>	<p>Antibióticos como ciprofloxacino, azitromicina y cefalexina pueden ser usados como marcadores de contaminación por</p>

<p><i>on the aquatic environment</i></p> <p><i>(Residuos de antibióticos en los efluentes finales de estaciones depuradoras de aguas residuales europeas y su impacto sobre el medio acuático)</i></p>	<p>diferentes países europeos. Evaluar las tendencias geográficas y temporales sobre la presencia de estos contaminantes. Inferir sobre el riesgo potencial para el medio ambiente y la salud humana que representan los residuos de antibióticos en los efluentes de las aguas residuales. Proponer herramientas analíticas sólidas y compuestos indicadores para su uso en programas regulares de monitoreo del agua, haciendo factible la comparación de estudios por países.</p>	<p>excepto en España y Noruega donde solo se muestreó una) y se monitorizaron 53 residuos de antibióticos pertenecientes a 10 clases terapéuticas diferentes. En cada una de estas campañas se tomaron muestras durante 24h, 3 días consecutivos (martes, miércoles y jueves). Para ello se utilizaron botellas de vidrio ámbar enjuagadas previamente con agua ultrapura para recoger aprox. 200-250 ml de aguas residuales de cada una de las plantas de tratamiento de aguas residuales y se transportan a 4 ° C al laboratorio.</p> <p>Antibióticos monitoreados: en total se monitorizaron 53 antibióticos pertenecientes a 10 clases diferentes en cada una de las muestras: fluoroquinolonas (n = 8), quinolonas (n = 4), penicilinas (n = 5), cefalosporinas (n = 6), macrólidos (n = 6), tetraciclinas (n = 4), lincosamidas (n = 2), sulfonamidas (n = 15), un inhibidor de la dihidrofolato reductasa (n = 1) y antibióticos nitromidazoles (n = 2).</p> <p>Análisis químico de las muestras: se realizó con un sistema de cromatografía líquida de ultra rendimiento (UPLC).</p> <p>Evaluación de los riesgos ambientales: riesgo ambiental asociado con los residuos de antibióticos liberados con los efluentes de la EDAR se evaluó mediante el cociente de riesgo (RQ), basados en datos empíricos.</p>	<p>Las concentraciones de antibiótico más altas se observaron para las fluoroquinolonas. De las cuatro que fueron detectadas, dos (enrofloxacin y orbifloxacin) se utilizan en medicina veterinaria y solo se detectaron en España y Chipre.</p> <p>Los macrólidos azitromicina y claritromicina se observaron en todos los países presentando sus concentraciones máximas en Portugal.</p> <p>De los 15 antibióticos de sulfonamida analizados, solo se detectaron sulfapiridina y sulfametoxazol en los efluentes finales, con valores máximos en Noruega y Chipre.</p> <p>Se detectaron tres de los antibióticos quinolónicos medidos (es decir, ácido nalidíxico, ácido oxolínico y ácido pipemídico) en al menos una muestra siendo sus valores máximos en una EDAR de Portugal (ácido pipemídico) e Irlanda (ácido nalidíxico y ácido oxolínico).</p> <p>Los países que exhibieron las concentraciones medias de efluentes más altas fueron Irlanda y los países del sur: Portugal y España. Por el contrario, Chipre, donde se utilizan tratamientos terciarios o biorreactores de membrana, y los países del norte exhibieron concentraciones totales más bajas de antibióticos. Por tanto, la cantidad de residuos de antibióticos consumida en los diferentes países coincide con la cantidad de residuos de estos detectados en los efluentes finales de sus EDARs, a excepción de Chipre donde, pese al elevado consumo de antibióticos se detectaron bajas concentraciones en el efluente final de las aguas residuales.</p>	<p>antibióticos y para la caracterización temporal y geográfica generalizada de aguas ambientales o efluentes de EDAR. Existe una gradación geográfica de norte a sur en términos de cantidades de antibióticos liberados en el medio ambiente siendo los compuestos con mayor carga en todos los países macrólidos y fluoroquinolonas. Pese a que las EDARs cumplen con la legislación vierten directamente productos como antibióticos a los ecosistemas acuáticos contribuyendo a la evolución de las resistencias bacterianas a los mismos pudiendo agravarse este problema en un futuro debido al aumento de la población, a la intensificación de la industria agrícola y a</p>
--	--	--	---	---

	<p><i>Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany</i></p> <p><i>(Evaluación de la diseminación de la Resistencia bacteriana a antibióticos a través de los efluentes de EDARs con diferentes áreas de captación en Alemania)</i></p>	Alemania	<p>Cuantificar la cantidad de 12 ARG, 5 FPB (bacterias patógenas facultativas) y un elemento genético móvil en el efluente de 23 EDARs diferentes de Alemania.</p>	<p>Recolección de las muestras: se tomaron un total de 92 muestras del efluente de 23 EDARs durante cuatro campañas de muestreo entre febrero y noviembre de 2018. Para ello se aspiraron volúmenes de 200 ml de cada efluente de agua individual a través de una membrana de policarbonato de 0,2 µm y se trataron con monoazida de propidio 0,25 mM para formar ADN libre complejo, así como ADN de bacterias muertas o lesionadas y se almacenaron a -20°C.</p> <p>Identificación de marcadores de genes taxonómicos y genes de resistencia a antibióticos: se realizó mediante PCRq. Se cuantificaron <i>Klebsiella pneumoniae</i> (gen <i>glt_A</i>), <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (gen <i>ecf_X</i>), <i>Escherichia coli</i> (gen <i>ycf_T</i>), <i>Acinetobacter baumannii</i> (gen <i>sece</i>) y <i>enterococos</i> (gen 23 S rRNA).</p> <p>Se estudiaron los genes de resistencia a antibióticos <i>sul_I</i> (resistencia a sulfametoxazol), <i>erm_B</i> (resistencia a eritromicina), <i>bla_{TEM}</i> (resistencia a β-lactámicos) y <i>tet_M</i> (resistencia a tetraciclina) ya que representan los ARG detectados con mayor frecuencia en aguas residuales urbanas. También se analizaron los genes de resistencia a antibióticos <i>bla_{CTX-M-1532}</i>, <i>bla_{CTX-M-3229}</i>, <i>bla_{OXA-48}</i>, (resistencias a carbapenemas) y <i>bla_{CMY-2}</i> (resistencia a ampicilina); genes de resistencia <i>mec_A</i> (resistencia a la metilicina en estafilococos), <i>van_A</i> (resistencia a la vancomicina), <i>mcr-1</i> (resistencia a la colistina) y <i>bla_{NDM-1}</i> (nueva deli-β-lactamasa).</p>	<p>Descargas diarias de AGR y FPB en el efluente de diferentes EDARs: para analizar la cantidad de ARG y FPB vertidos diariamente por cada EDAR investigada, se calculó una suma de todos los ARG (de bacterias vivas y de bacterias lesionadas o muertas) y genes marcadores taxonómicos detectados para cada EDAR y se comparó con el volumen de efluente diario correspondiente de la EDAR.</p> <p>Resistencia bacteriana a los antibióticos: se calculó que la descarga diaria promedio en todas las plantas de tratamiento de aguas residuales era de 3.30×10^{14} equivalentes de células AGR al día (se utilizó este término debido al uso de bacterias de referencia portadoras del respectivo gen de resistencia a antibióticos para el cálculo de la cantidad de ARB derivadas del ADN genómico de comunidades microbianas en las muestras de agua).</p> <p>El 99,8-99,9% de la descarga diaria equivalente de células ARG total consistió en ARG contra macrólidos (<i>erm_B</i>), tetraciclina (<i>tet_M</i>), β-lactama (<i>bla_{TEM}</i>) y sulfonamida (<i>sul_I</i>).</p> <p>El 0.03-0.17% de la descarga diaria total equivalente de células ARG lo constituyeron los genes de resistencia a β-lactámicos <i>bla_{CMYC2}</i>, <i>bla_{CTX-M15}</i>, <i>bla_{CTX-M32}</i> y el gen de resistencia a carbapenemas <i>bla_{OXA48}</i>, que transportan enzimas contra los antibióticos de último recurso en bacterias Gramnegativas multirresistentes.</p> <p>Sólo el 0,0001-0,00016% de la descarga diaria total equivalente a células ARG consistió en genes de resistencia a antibióticos contra antibióticos de último recurso (resistencia a carbapenemas <i>bla_{NDM-1}</i>, resistencia a vancomicina <i>van_A</i>, resistencia a metilicina <i>mec_A</i>, resistencia a colistina <i>mcr-1</i>).</p> <p>Estos dos últimos grupos de genes se encontraban, sobre todo, en elementos genéticos móviles.</p>	<p>la escasez de agua de algunos países.</p> <p>La cuantificación absoluta demostró que todos los genes de resistencia a antibióticos y dianas bacterianas patógenas facultativas seleccionadas para este estudio pasaron por las EDARs y se liberaron con los efluentes al medio ambiente, independientemente de los tamaños y volúmenes diarios de descarga de aguas residuales de las plantas de tratamiento investigadas. Además, la cantidad de ARG y de PFB es mayor en el efluente de las EDARs influenciadas por aguas residuales hospitalarias. Por tanto, las aguas receptoras conllevan un posible riesgo para la salud al colonizar a los humanos con estas haciendo necesaria la implantación de unos sistemas</p>
--	--	----------	--	--	---	---

					<p>Bacterias patógenas facultativas: se calcularon las descargas diarias de FPB totales y de cada EDAR utilizando marcadores genéticos específicos de la especie para cuantificar <i>E. coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>K. pneumoniae</i>, <i>A. baumannii</i> y <i>enterococos</i>. En general, todos los efluentes de las EDARs contenían los cinco FPB estudiados con valores de descarga medianos.</p>	<p>avanzados de tratamiento combinado en las EDARs para detener la diseminación de genes resistentes a los antibióticos en bacterias patógenas facultativas.</p>
11	<p><i>Impact of Sediment Concentration on the Survival of Wastewater-Derived bla_{CTX-M-15} Producing E. coli, and the Implications for Dispersal into Estuarine Waters.</i></p> <p>(El impacto de la concentración de los sedimentos en la supervivencia de <i>E. coli</i> portadora de bla_{CTX-M-15} en aguas residuales y sus implicaciones sobre los estuarios)</p>	Gales	<p>Evaluar el impacto de las concentraciones de sedimentos en la tasa de inactivación de <i>E. coli</i> resistente después de la liberación de aguas residuales humanas en agua dulce. Simular la posterior dispersión a la costa cercana durante un evento en el que se produjeron lluvias intensas coincidiendo con la marea alta de primavera en el estuario de Conwy, en el norte de Gales (el peor de los escenarios).</p>	<p>Recolección de las muestras: se tomaron muestras de agua por triplicado a 15 cm debajo de la superficie del agua y a 200 m de la desembocadura de la principal EDAR de la zona utilizando botellas vidrio de 1 L preesterilizadas y luego se transfirieron a botellas de vidrio de 2 L y se transportaron a 4 °C al laboratorio entre 1 y 2 h después de la recolección.</p> <p>Estudio de microcosmos: se obtuvieron tres niveles diferentes de turbidez del agua (baja, media y alta) por triplicado para cada muestra y a 190 ml de cada uno se le añadieron 10 ml de las muestras preparadas anteriormente en un recipiente de vidrio de 250 ml. Estas muestras se expusieron a luz ultravioleta durante un máximo de 8 h en un simulador solar.</p> <p>Identificación y aislamiento de <i>E. coli</i>: se emplearon placas de Agar cromogénico para el cultivo e identificación de <i>E. coli</i> y otras pruebas para identificar cepas de <i>E. coli</i> productoras de BLEEs.</p> <p>Detección del gen bla_{CTX-M-15} mediante PCR single-plex: para la caracterización genotípica de las cepas productoras de BLEEs se emplearon ensayos de PCR de un solo plexo y una serie de cebadores. De este modo se identificaron genes bla_{CTX-M} del grupo 1.</p>	<p>Influencia de la turbidez del agua en la supervivencia de <i>E. coli</i> portadora de bla_{CTX-M-15}: en general, los recuentos medios de <i>E. coli</i> productora de bla_{CTX-M-15} entre turbidez baja, media y alta fueron significativamente diferentes, con una mayor supervivencia a mayor turbidez.</p> <p>Dispersión de <i>E. coli</i> portadora de bla_{CTX-M-15} en el estuario receptor: el agua de alta turbidez puede ayudar a prolongar la supervivencia de <i>E. coli</i> portadora de bla_{CTX-M-15} liberada de una planta de tratamiento de aguas residuales. Según las simulaciones (lluvias intensas y mareas altas) la <i>E. coli</i> portadora de bla_{CTX-M-15} se mezcló con el agua de mar a medida que se dispersaba río abajo hacia el estuario, reduciendo la concentración.</p>	<p>Las plantas de tratamiento de aguas residuales son una fuente conocida de <i>E. coli</i> portadora de bla_{CTX-M-15} resistente a los antibióticos lo que supone un importante problema para la salud pública. El destino de estas bacterias resistentes una vez que salen de las EDARs y son liberadas a aguas dulces está influido por diferentes factores como son la turbidez del agua y la radiación UV de modo que, a mayor turbidez y menor radiación UV, mayor supervivencia de bacterias resistentes en las aguas receptoras siendo la primavera y el invierno las épocas</p>

						de mayor contaminación de las aguas por estos patógenos.
12	<p><i>Investigating the effects of municipal and hospital wastewaters on horizontal gene transfer.</i></p> <p><i>(Investigando los efectos de las aguas residuales municipales y hospitalarias en la transferencia horizontal de genes)</i></p>	Suecia	<p>Investigar sobre el papel que juegan las aguas residuales municipales y hospitalarias en la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos.</p>	<p>Recolección de las muestras: se tomaron muestras de las aguas residuales que se analizarán como inductoras durante los ensayos de conjugación recolectaron en cuatro campañas entre octubre de 2018 y abril de 2019 en dos sitios diferentes. Con el fin de preparar una comunidad bacteriana donante para ser utilizada en diferentes experimentos se recogió una muestra de 10 ml del efluente de una EDAR municipal de Gotemburgo.</p> <p>La cepa CV601 de <i>Escherichia coli</i> resistente a kanamicina y rifampicina que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) se utilizó como receptor.</p> <p>Ensayo de conjugación: se mezclaron 125 ml de comunidad de donantes y 100 ml de receptor y se colocaron en un filtro que, a su vez, cada uno de estos filtros se colocó en placas LB suplementadas con agua residual esterilizada por filtración, tetraciclina o se dejaron sin suplementar como controles.</p> <p>Contenido químico de las muestras de aguas residuales: se utilizó una fracción de cada una de las muestras de aguas residuales filtradas para medir su contenido químico. Se empleó un panel de 24 antibióticos (amoxicilina, azitromicina, bencilpenicilina, cefadroxil, cefotaxima, cefalexina, ciprofloxacina, claritromicina, clindamicina, eritromicina, metronidazol, nitrofurantoína, meropenem, norfloxacin, , tetraciclina y trimetoprima) que son los más utilizados en Suecia y también se incluyeron la clorhexidina y otros seis fármacos no antibióticos (carbamazepina, diclofenaco, gemfibrozil, ibuprofeno, naproxeno y</p>	<p>Inducción de la transferencia de resistencia a antibióticos: la tetraciclina aumentó la transferencia de resistencia al sulfametoxazol de la comunidad donante a la cepa receptora en una forma de respuesta a la dosis.</p> <p>Ensayos de conjugación con aguas residuales: en ausencia de aguas residuales se observaron $2,44 \times 10^6$ transconjugantes por receptor. En comparación con las condiciones de control, la exposición a las aguas residuales municipales no provocó un cambio significativo en el número de transconjugantes por receptor. Por el contrario, las aguas residuales hospitalarias aumentaron significativamente el número de transconjugantes por receptor a $4,63 \times 10^6$.</p> <p>Contenido químico de las muestras de aguas residuales: el análisis del contenido químico de las muestras de aguas residuales mostró que casi todos los antibióticos, biocidas y fármacos estaban más concentrados en las aguas residuales hospitalarias que en las municipales, aunque en casi todos los casos se encontraban en concentraciones por debajo de la CMI.</p> <p>Efecto de las aguas residuales sobre el receptor y los transconjugantes individuales: los ensayos de placa mostraron que los bacteriófagos que se dirigen a la cepa receptora están más concentrados en las aguas residuales municipales filtradas de forma estéril (156,2 PFU / ml) que en las aguas residuales hospitalarias filtradas de forma estéril (13,0 PFU / ml).</p>	<p>Este estudio muestra que el contenido de las aguas residuales hospitalarias puede afectar a la abundancia relativa de bacterias resistentes, pero se necesitan más investigaciones para dilucidar los efectos del contenido abiótico complejo en las aguas residuales sobre la evolución de la resistencia, tanto con respecto a la inducción de HGT. y selección.</p>

				<p>propranolol) que previamente se informó que inducían HGT. Para realizar estas mediciones se empleó la cromatografía líquida-espectrometría de masas (LC-MS).</p> <p>Cuantificación de los bacteriógrafos en las muestras de aguas residuales: para medir la concentración de bacteriófagos dirigidos a la cepa receptora en aguas residuales municipales y hospitalarias se realizó un ensayo de placa con dos muestras del tipo respectivo de aguas residuales, por triplicado.</p> <p>Efecto de las aguas residuales sobre cepas bacterianas aisladas: se midió durante el ensayo de conjugación.</p>		
--	--	--	--	--	--	--

5. DISCUSIÓN Y SOLUCIONES.

Pese al gran hito en la historia de la medicina que supuso el descubrimiento de los antibióticos y, el posterior desarrollo de los mismos a lo largo de todos estos años, a día de hoy no existe la menor duda de que nos encontramos ante un grave problema mundial como es la resistencia bacteriana a estos compuestos, considerado actualmente, no solo un problema de salud sino también un problema ecológico por la estrecha relación existente entre el y el medioambiente.

Como se mencionó al inicio de este trabajo, todo esto es consecuencia del descubrimiento de nuevos antibacterianos con el fin de utilizarlos para el tratamiento de infecciones para las que ya no eran eficaces los previamente existentes en lugar de buscar opciones alternativas como optimizar el empleo de los fármacos ya existentes, del uso indiscriminado e irracional de los antibióticos, tanto en seres humanos, como en agricultura, ganadería o veterinaria, donde su control es todavía más difícil que en humanos, y, de la presión evolutiva generada por su uso terapéutico ya que como se vio, la resistencia bacteriana es un mecanismo que ocurre de forma natural en la naturaleza.

En este trabajo nos centramos en comprobar la relación existente entre la resistencia bacteriana a los antibióticos y las aguas residuales partiendo de que, numerosos estudios afirman que las estaciones depuradoras de aguas residuales (EDARs) actúan como reservorio y vehículo de transmisión de determinantes de resistencia a estos compuestos. Tras realizar una revisión sistemática en la que se analizaron doce estudios recientes acerca de este tema podemos afirmar que esta relación es cierta y que, las aguas residuales y estaciones depuradoras de las mismas, desempeñan un papel muy importante en la propagación de resistencias bacterianas al medioambiente, al contar con unas condiciones óptimas para ello (temperatura, presencia de bacterias ambientales y bacterias patógenas, residuos de antibióticos y otros fármacos, etc.).

Por tanto, podemos afirmar que los mecanismos llevados a cabo en las EDARs no son suficientes para eliminar de forma eficaz a todos estos compuestos y, este problema se agrava cuanto más convencionales son los tratamientos utilizados. Sin embargo, es un problema difícil de resolver ya que se comprobó que incluso en los países en los que se hace una importante inversión económica y se aplican nuevas tecnológicas tampoco se resuelve de todo, ya que permiten la llegada de concentraciones subinhibitorias de antibióticos a las aguas receptoras, las cuales, se comprobó que son suficientes para la selección de cepas resistentes.

Además, tal y como demuestran algunos estudios, el problema no solo radica en que las EDARs no sean capaces de eliminar antibióticos y bacterias de los afluentes que les llegan, sino que, además, en muchos casos, los efluentes salen de aquí enriquecidos con ARG y ARB, después de pasar por los procesos de tratamiento y, por lo tanto, las EDARs constituyen puntos críticos para la propagación de determinantes de resistencia a antibióticos al medioambiente. Tal es la magnitud del problema que, algún estudio determinó que las concentraciones de antibióticos y de determinantes de resistencia a los mismos encontrados en aguas residuales reflejan el consumo de antibióticos y la resistencia a los mismos que existe en la población a la que abastecen esas aguas.

Todo este problema se ve incrementado por el hecho de que los trabajadores de las estaciones depuradoras están expuestos a estos determinantes de resistencia y, por lo tanto, contribuyen a su vez a la propagación de las mismas y, tampoco nos podemos olvidar, de que las EDARs son una de las fuentes de contaminación puntual más importante de los estuarios a través de los cuales nos ponemos en contacto los seres humanos, ya sea a través de alimentos como los moluscos o de la realización de actividades de ocio.

Este es un problema difícil de resolver que debe empezar por disminuir el consumo humano de antibióticos lo que depende principalmente de médicos, farmacéuticos y, sobre todo, de los propios pacientes. Para ello es fundamental llevar a cabo un seguimiento estricto de las resistencias bacterianas en los laboratorios, así como del consumo de antibióticos. También es necesaria una organización adecuada del sistema sanitario para favorecer el buen uso de mismos y una formación básica y continuada de los profesionales sanitarios (médicos, farmacéuticos, veterinarios, etc.) sobre el uso de los antibióticos y el desarrollo y control de las resistencias bacterianas. Y, no nos podemos olvidar de uno de los mecanismos más importantes para tratar de paliar este problema como es la formación de la población para que tome conciencia del problema y deje atrás malos hábitos como el de la automedicación o el inconformismo de salir de una consulta sin haberle sido recetado uno de estos fármacos.

También se necesita la instauración de medidas en todo el mundo, regulando el uso de estos fármacos en veterinaria, ganadería y agricultura, ya que como se vio, el consumo de antibióticos en estos ámbitos es mayor que en seres humanos y es mucho más difícil de controlar. Además, a su vez, a través de estas prácticas, las personas nos ponemos en íntimo contacto con los antibacterianos. Para ello se necesita eliminar el incentivo económico que supone el uso de estas sustancias y realizar un seguimiento estricto del uso de estos fármacos no solo en humanos.

Sería interesante que la industria farmacéutica formase parte de las políticas de lucha contra la resistencia bacteriana y, que las autoridades políticas sanitarias responsables se coordinasen y buscasen soluciones y políticas comunes en todo el mundo para solventar el problema.

Acerca de las estaciones depuradoras, se necesita que se sigan investigando nuevas técnicas para el tratamiento de las aguas residuales, así como adecuados sistemas de ventilación para la mismas. También es muy importante que se establezcan normativas para regular el funcionamiento de las mismas y llevar a cabo una vigilancia adecuada para verificar que se cumplen las medidas.

A pesar de que la mayor parte de los estudios existentes acerca del tema a tratar llegan a conclusiones similares y coinciden en que las aguas residuales y sus estaciones depuradoras constituyen puntos críticos para la propagación de las resistencias, continúa habiendo resultados contradictorios por lo que es necesario llevar a cabo más estudios sobre este aspecto. Sería interesante que se realizasen estudios en más países y que se continuase investigando sobre como afectan los factores abióticos a las concentraciones de estas sustancias en las aguas. También son necesarios estudios más equiparables entre sí, con un análisis de EDARs correctamente definidas y similares en cuanto al origen de las aguas afluentes (urbano, hospitalario, ganadería, agricultura, etc.), tamaño, población a la que abastecen, etc.

6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Bado I, Cordeiro N, García V, Robino L, Seija V, Vignoli R. PRINCIPALES GRUPOS DE ANTIBIÓTICOS. :23.
2. ANTIBIÓTICO [Internet]. Etimologías de Chile - Diccionario que explica el origen de las palabras. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <http://etimologias.dechile.net/?antibio.tico>
3. Beloso WH. Historia de los antibióticos. 2009;29:10.
4. Seija V, Vignoli R. 34 Principales grupos de antibióticos. :18.
5. Calvo J, Martínez-Martínez L. Mecanismos de acción de los antimicrobianos. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica [Internet]. enero de 2009 [citado 29 de abril de 2021];27(1):44-52. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0213005X08000177>
6. Gérvas J. La resistencia a los antibióticos, un problema de salud pública. Aten Primaria [Internet]. 2000 [citado 29 de abril de 2021];25(8):589-96. Disponible en: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0212656700785738>
7. La OMS advierte de que el mundo avanza hacia una peligrosa era postantibiótica [Internet]. RT en Español. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://actualidad.rt.com/ciencias/view/126814-salud-bacterias-antibioticos-medicamentos-enfermedades>
8. OMS | Reunión de las Naciones Unidas sobre la resistencia a los antimicrobianos [Internet]. WHO. World Health Organization; [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <http://www.who.int/bulletin/volumes/94/9/16-020916/es/>
9. md133i.pdf [Internet]. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.medigraphic.com/pdfs/revmed/md-2013/md133i.pdf>
10. Vignoli R, Seija V. mecanismos de resistencia antibiótica. :14.
11. says M. El medio ambiente, clave en la lucha contra la resistencia a los antibióticos [Internet]. Acta Sanitaria. 2020 [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.actasanitaria.com/medio-ambiente-clave-lucha-resistencia-antibioticos/>
12. Resistencia a los antimicrobianos [Internet]. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/antimicrobial-resistance>
13. Alós J-I. Resistencia bacteriana a los antibióticos: una crisis global. Enfermedades Infecc Microbiol Clínica [Internet]. 1 de diciembre de 2015 [citado 29 de abril de 2021];33(10):692-9. Disponible en: <https://www.elsevier.es/es-revista-enfermedades-infecciosas-microbiologia-clinica-28-articulo-resistencia-bacteriana-antibioticos-una-crisis-S0213005X14003413>

14. Lara M, Torres M, Baez M, Albertini S. GENERAL ASPECTS OF ANTIMICROBIALS USE AND THEIR INTERACTION WITH THE ENVIRONMENT: AN EMERGING PROBLEM. *Compend Cienc Vet* [Internet]. 30 de diciembre de 2019 [citado 29 de abril de 2021];9(2):24-37. Disponible en: http://scielo.iics.una.py/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2226-17612019000200024&lng=es&nrm=iso&tlng=es
15. Elsevier. “Las bacterias resistentes se generan por un proceso de selección natural” [Internet]. Elsevier Connect. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.elsevier.com/es-es/connect/medicina/las-bacterias-resistentes-se-generan-por-un-proceso-de-seleccion-natural>
16. Solaun O, Larreta J, Menchaca I, Rodríguez JG, López E, Martínez E, et al. TÍTULO DEL DOCUMENTO: Estudio de sustancias de la lista de observación (Decisión UE 2015/495 y Decisión UE 2018/840) en la costa vasca. Periodo 2017- 2019. :38.
17. Reinthaler FF, Feierl G, Galler H, Haas D, Leitner E, Mascher F, et al. ESBL-producing *E. coli* in Austrian sewage sludge. *Water Res* [Internet]. 1 de marzo de 2010 [citado 29 de abril de 2021];44(6):1981-5. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135409008082>
18. Related actions of probiotics and antibiotics on gut microbiota and weight modification - The Lancet Infectious Diseases [Internet]. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: [https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099\(13\)70179-8/fulltext](https://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099(13)70179-8/fulltext)
19. Co-selection of antibiotic and metal resistance: Trends in Microbiology [Internet]. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: [https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X\(06\)00051-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X06000515%3Fshowall%3Dtrue](https://www.cell.com/trends/microbiology/fulltext/S0966-842X(06)00051-5?_returnURL=https%3A%2F%2Flinkinghub.elsevier.com%2Fretrieve%2Fpii%2FS0966842X06000515%3Fshowall%3Dtrue)
20. Valdivielso A. ¿Qué es una EDAR? [Internet]. *iAgua. iAgua*; 2020 [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.iagua.es/respuestas/estacion-depuradora-aguas-residuales>
21. Calleja MS, Vázquez MB, Pena LR, Corral MA. Estación Depuradora de Aguas Residuales. :22.
22. Greenpeace denuncia que sólo el 11% del agua de los ríos españoles es aceptable | Hispagua [Internet]. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://hispagua.cedex.es/documentacion/noticia/43593>
23. La depuración de las aguas residuales - Agua [Internet]. [citado 29 de abril de 2021]. Disponible en: <https://www.interempresas.net/Agua/Articulos/36895-La-depuracion-de-las-aguas-residuales.html>
24. Pazda M, Rybicka M, Stolte S, Piotr Bielawski K, Stepnowski P, Kumirska J, et al. Identification of Selected Antibiotic Resistance Genes in Two Different Wastewater Treatment Plant Systems in Poland: A Preliminary Study. *Molecules* [Internet]. enero de

2020 [citado 30 de abril de 2021];25(12):2851. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1420-3049/25/12/2851>

25. Kozajda A, Ježak K. Occupational exposure to *Staphylococcus aureus* in the wastewater treatment plants environment. *Med Pr* [Internet]. 15 de mayo de 2020 [citado 30 de abril de 2021];71(3):265-78. Disponible en: <http://medpr.imp.lodz.pl/OCCUPATIONAL-EXPOSURE-TO-STAPHYLOCOCCUS-AUREUS-IN-WASTEWATER-TREATMENT-PLANT-ENVIRONMENT,117713,0,2.html>

26. Smyth C, O’Flaherty A, Walsh F, Do TT. Antibiotic resistant and extended-spectrum β -lactamase producing faecal coliforms in wastewater treatment plant effluent. *Environ Pollut* [Internet]. 1 de julio de 2020 [citado 30 de abril de 2021];262:114244. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749119367429>

27. Fonseca E, Hernández F, Ibáñez M, Rico A, Pitarch E, Bijlsma L. Occurrence and ecological risks of pharmaceuticals in a Mediterranean river in Eastern Spain. *Environ Int* [Internet]. 1 de noviembre de 2020 [citado 30 de abril de 2021];144:106004. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412020319590>

28. Pantanella F, Lekunberri I, Gagliardi A, Venuto G, Sánchez-Melsió A, Fabiani M, et al. Effect of Urban Wastewater Discharge on the Abundance of Antibiotic Resistance Genes and Antibiotic-Resistant *Escherichia coli* in Two Italian Rivers. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. enero de 2020 [citado 30 de abril de 2021];17(18):6813. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/18/6813>

29. Lépesová K, Olejníková P, Mackuřak T, Cverenkárová K, Krahulcová M, Bírošová L. Hospital Wastewater—Important Source of Multidrug Resistant Coliform Bacteria with ESBL-Production. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. enero de 2020 [citado 30 de abril de 2021];17(21):7827. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/21/7827>

30. Marano RBM, Fernandes T, Manaia CM, Nunes O, Morrison D, Berendonk TU, et al. A global multinational survey of cefotaxime-resistant coliforms in urban wastewater treatment plants. *Environ Int* [Internet]. 1 de noviembre de 2020 [citado 30 de abril de 2021];144:106035. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160412020319905>

31. Huijbers PMC, Larsson DGJ, Flach C-F. Surveillance of antibiotic resistant *Escherichia coli* in human populations through urban wastewater in ten European countries. *Environ Pollut* [Internet]. 1 de junio de 2020 [citado 30 de abril de 2021];261:114200. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749119363195>

32. Rodríguez-Mozaz S, Vaz-Moreira I, Varela Della Giustina S, Llorca M, Barceló D, Schubert S, et al. Antibiotic residues in final effluents of European wastewater treatment plants and their impact on the aquatic environment. *Environ Int* [Internet]. 1 de julio de 2020 [citado 30 de abril de 2021];140:105733. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016041201934886X>

33. Alexander J, Hembach N, Schwartz T. Evaluation of antibiotic resistance dissemination by wastewater treatment plant effluents with different catchment areas in Germany. *Sci Rep* [Internet]. 2 de junio de 2020 [citado 30 de abril de 2021];10. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7265433/>
34. Bashawri YM, Robins P, Cooper DM, McDonald JE, Jones DL, Williams AP. Impact of Sediment Concentration on the Survival of Wastewater-Derived blaCTX-M-15-Producing *E. coli*, and the Implications for Dispersal into Estuarine Waters. *Int J Environ Res Public Health* [Internet]. enero de 2020 [citado 1 de mayo de 2021];17(20):7608. Disponible en: <https://www.mdpi.com/1660-4601/17/20/7608>
35. Hutinel M, Fick J, Larsson DGJ, Flach C-F. Investigating the effects of municipal and hospital wastewaters on horizontal gene transfer. *Environ Pollut* [Internet]. 1 de mayo de 2021 [citado 1 de mayo de 2021];276:116733. Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0269749121003134>